

Departement Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ACVS/ECVS

---

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)  
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

**Imprägnierung von  $\beta$ -TCP Keramiken mit biomimetischen  
Substanzen zur Beschleunigung der Knochenbildung in einer  
experimentellen Studie in Schafen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Vetsuisse Fakultät  
Universität Zürich

vorgelegt von  
Friederike von Wedel  
Tierärztin  
aus Ulm (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg, Referentin  
Prof. Dr. Hans Geyer, Korreferent

Zürich 2009



Meinen Eltern



Zusammenfassung .....	1
Summary .....	2
1 Einleitung .....	3
1.1 Problemstellung .....	3
1.2 Zielsetzung der Arbeit .....	4
1.3 Knochen-Defektheilung .....	4
1.4 Knochenersatzstoffe .....	6
1.4.1 Kalziumphosphatkeramiken als Knochenersatzstoffe .....	6
1.5 Biomimetische Substanzen .....	8
1.5.1 Hydroxyfasudil (Hy) .....	8
1.5.2 Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) .....	9
1.5.3 Autologe Biomimetika .....	11
2 Material und Methoden .....	12
2.1 Aufbau der Studie .....	12
2.2 Implantatherstellung und Vorbereitung .....	13
2.3 Tierversuch .....	13
2.4 Tiere .....	13
2.5 Vorbereitung und Anästhesie .....	14
2.6 Operation .....	15
3 Evaluation .....	18
3.1 Probengewinnung und Aufbereitung .....	18
3.2 Makroskopische Evaluation .....	19
3.3 Radiologische und mikroradiologische Evaluation .....	20
3.4 Histomorphometrische Evaluation .....	20
3.5 Histologische Evaluation .....	20
3.6 Computertomographische Evaluation .....	22
3.7 Statistik .....	22
3.8 Evaluation der Konzentrationen der biomimetischen Substanzen .....	23
4 Ergebnisse .....	24
4.1 Operation .....	24
4.2 Postoperative Phase .....	24
4.3 Makroskopische Resultate .....	25
4.4 Radiologische und mikroradiologische Resultate .....	25
4.5 Histomorphometrische Resultate .....	25
4.5.1 Knochenbildung .....	26
4.5.2 Bindegewebe .....	27
4.5.3 Biomaterial .....	27
4.6 Histologische Resultate .....	27
4.6.1 Proteoglykanablagerungen .....	28
4.6.2 Zellen .....	29
4.7 Resultate des Mikro CT's .....	30
4.8 Konzentrationen der biomimetischen Substanzen .....	35

5	Diskussion .....	36
5.1	Versuchsmodell .....	36
5.2	Implantatherstellung und Vorbereitung .....	37
5.3	Operation .....	37
5.4	Postoperative Phase .....	38
5.5	Makroskopische Resultate .....	39
5.6	Probenaufbereitung und –auswertung .....	40
5.7	Histomorphometrische Resultate .....	41
5.8	Histologische Resultate .....	43
5.9	Resultate des Mikro CT's .....	44
5.10	Schlussfolgerung und Perspektiven .....	45
6	Literaturverzeichnis .....	47
7	Anhang .....	53
8	Abkürzungsverzeichnis .....	65
9	Danksagung .....	66

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden fünf verschiedene Implantatgruppen im Schafmodell auf ihre Biokompatibilität, Osteokonduktion, -induktion und -integration in zwei unterschiedlichen Defektlokalisationen nach einem Zeitraum von zwei Monaten untersucht. Als Träger dienten bei allen Gruppen speziell zugeschnittene chronOS-Rohlinge in Zylinderform. Neben einer unbehandelten Vergleichsgruppe wurden zwei Gruppen mit Prostaglandin E<sub>2</sub> in den Konzentrationen 1µM (PGE<sub>2</sub> 1) und 50µM (PGE<sub>2</sub> 50) und weitere zwei Gruppen mit Hydroxyfasudil in den Konzentrationen 10µM (Hy 10) und 100µM (Hy100) imprägniert. Es wurden acht Millimeter dicke Bohrlochdefekte im Condylus medialis des Femurs und der Tuberositas tibiae beider Hintergliedmaßen gesetzt und nach Schlachtung der Schafe makroskopisch, radiologisch, histomorphometrisch und histologisch beurteilt. Alle Implantate zeigten eine gute Biokompatibilität, Osteointegration und -konduktion. Die besten osteoinduktiven Eigenschaften waren bei Gruppe PGE<sub>2</sub> 50 festzustellen, dicht gefolgt von der Gruppe Hy10. Die höher dosierte Hy 100-Gruppe und die niedriger dosierte PGE<sub>2</sub> 1-Gruppe zeigten hingegen, ähnlich wie die Kontrollgruppe, deutlich geringere osteoinduktive Fähigkeiten. Diese Studie konnte somit nachweisen, dass sowohl PGE<sub>2</sub> als auch Hy als bioaktive Stoffe konzentrationsabhängig die osteogenetischen Eigenschaften der Keramiken steigern und damit eine Verbesserung im klinischen Einsatz darstellen können. Die optimale Dosierung von PGE<sub>2</sub> und Hy sollte jedoch in weiterführenden Versuchen noch genauer definiert werden.

### Summary

The aim of this experimental study in sheep was to evaluate five implantation groups relating to their biocompatibility as well as their osteoconductive, -inductive and integrative properties after an observation period of eight weeks. An established drill hole model was chosen and, after creating eight millimeter defects into both medial femoral condyles and tibial tuberositas, special cylindric chronOS-blocks were implanted as scaffolds. One group with untreated blocks served as a control, whereas the remaining defects were filled with either Prostaglandin E<sub>2</sub> impregnated blocks at concentration of 1µM (PGE<sub>2</sub> 1) and 50µM (PGE<sub>2</sub> 50) or with Hydroxyfasudil impregnated blocks at concentration of 10µM (Hy 10) and 100µM (Hy100). The obtained samples were harvested and assessed macroscopically, radiographically, histomorphometrically and histologically. All implants showed great biocompatibility, osteointegration- and conduction. Superior osteoinduction was observed at PGE<sub>2</sub> 50-, closely followed by Hy10-concentrations. Similar to the control group, the higher dosed Hy 100- and the lower dosed PGE<sub>2</sub> 1-group showed less osteoinductive properties. Therefore the present study demonstrated the potential capability of PGE<sub>2</sub> and Hy to enhance the osteogenetic properties of the chronOS-scaffolds in dependency on their concentrations and thereby might improve its clinical application. However, further studies are required to determine the optimal dose of PGE and Hy.



# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Seit über hundert Jahren werden bei Mensch und Tier Knochenersatzmaterialien eingesetzt. Zu ihren Indikationen gehören beispielsweise die Überbrückung von Knochendefekten nach Frakturen, Traumata oder Infektionen, die Korrektur von Fehlstellungen, Pseudoarthrosen oder der Einsatz in der Tumor- und Endoprothesenchirurgie<sup>1,2</sup>.

Der optimale Knochenersatz sollte dabei durch die Fähigkeit zur Knocheneigensynthese osteogenetisch bzw. osteoinduktiv wirken, d.h. die Knochenneubildung durch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren anregen. Gleichzeitig sollte er auch gute osteokonduktive Eigenschaften aufweisen<sup>1</sup>. Ziel ist es, Menge, Qualität und Zeiteinheit der Knochenneubildung und -heilung zu verbessern und zu beschleunigen<sup>2</sup>. Darüber hinaus sind auch Faktoren wie eine gute mechanische Stabilität, Sterilität, wenig Nebenwirkungen oder immunologische Abwehrreaktionen, eine unbegrenzte Verfügbarkeit in verschiedenen Formen und Größen sowie ökonomische Gesichtspunkte von großer Bedeutung<sup>1,2</sup>. Der Knochenersatz sollte chemisch inert, formstabil, aber auch gut modellierbar sein und von lebendem Knochen durchbaut oder ersetzt werden können<sup>3</sup>.

Noch immer gilt das autogene Knochentransplantat wegen seiner hervorragenden osteogenetischen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften aber auch aufgrund fehlender Alternativen als Goldstandard<sup>1,2,4,5</sup>. Nachteile, wie die Notwendigkeit eines schmerzhaften Zweiteingriffs mit oftmals unvorhersehbaren Komplikationen, chronische Schmerzen an den Entnahmestellen, eine begrenzte Verfügbarkeit der autogenen Knochentransplantaten und hohe Kosten<sup>1,2,5-7</sup> führten allerdings schon früh zur Suche nach entsprechenden Alternativen.

Allo- und Xenografts besitzen als weitere biologische Knochentransplantate ähnlich gute Eigenschaften wie die Autografts, sind aber auch mit Komplikationen verbunden. Neben starken immunologisch bedingten Reaktionen ist im Fall von Allografts die Übertragung von Krankheiten wie Aids und Tollwut ein ernstzunehmendes Risiko<sup>1,5-7</sup>. Synthetische Knochenersatzstoffe gewinnen daher als Alternative mehr und mehr an Bedeutung. Eine ideale Komposition könnte dabei laut Lienhard et al. aus einem Trägermaterial vereint mit einer biologisch wirksamen Substanz bestehen<sup>8</sup>.

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Studie sollten synthetische  $\beta$ -Trikalziumphosphat-Keramiken ( $\beta$ -TCP), die mit biomimetischen Substanzen imprägniert worden waren, auf ihre Eignung als Knochenersatzstoff getestet werden. Der Versuch wurde mit Hilfe eines „critical size defects“ an Femur und Tibia von Schafen durchgeführt. Bei den vier Gruppen handelte es sich um chronOS- Blöcke, die mit Hydroxyfasudil und ProstaglandinE<sub>2</sub> in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt worden waren. Als Kontrolle diente eine Gruppe mit unbehandelten chronOS- Blöcken. Mit den Ergebnissen der makroskopischen, radiologischen, histomorphometrischen und histologischen Untersuchungen sollten Aussagen über das Ausmaß der knöchernen Regeneration, die Biokompatibilität und das Abbauverhalten der Keramiken gemacht und ihre Fähigkeit zur Osteointegration, Osteokonduktion und Osteoinduktion beurteilt werden. Dabei war vor allem von Interesse, ob und in welcher Konzentration die mit biomimetischen Substanzen versetzten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe eine beschleunigte Knochenbildung aufwiesen und damit eine Verbesserung im klinischen Einsatz darstellen könnten.

## 1.3 Knochen-Defektheilung

Grundsätzlich werden die direkte und die indirekte Knochenheilung unterschieden. Bei der erstgenannten wird ein sehr enger Bruchspalt direkt von Osteonen und Gefäßen durchwachsen und, ohne die Bildung von Kallus, überbrückt<sup>9,10</sup>. Die indirekte Knochenheilung, die immer mit Kallusbildung einhergeht, wird in vier nacheinander ablaufende Phasen unterteilt: Entzündung, weicher Kallus, harter Kallus und Remodellierung. In der ersten Phase werden aus Zellen des Bruchhämatoms bestimmte Signalmoleküle (Interleukine, Wachstumshormone) und Entzündungsmediatoren (NO, PGE<sub>2</sub>) freigesetzt. Sie bewirken die chemotaktische Anlockung von Mesenchym- und Entzündungszellen, die Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten (IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub>) und Osteoblasten sowie eine gesteigerte Bildung von extrazellulärer Matrix. Freigesetzte Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF)) stimulieren die weitere Proliferation von Mesenchymzellen. Das hierbei entstandene Granulationsgewebe differenziert sich in der zweiten Phase unter Einfluss von weiteren Faktoren (insulin-like growth factor (IGF), transforming growth factor- $\beta$  (TGF), bone morphogenetic protein (BMP)) zu weichem bindegewebigem Kallus und anschließend zu Faserknorpel<sup>9</sup>. In Phase drei kommt es zur Kalzifizierung

des Knorpels. Dieser wird anschließend durch Chondroklasten abgebaut<sup>11</sup>. Einsproßende Gefäße sorgen für die Zufuhr von Sauerstoff und Mineralstoffen und das Einwandern von Makrophagen und Monozyten<sup>9</sup> sowie perivaskularer Progenitorzellen als Vorläufer für Osteoblasten<sup>10</sup>. Der gleichzeitig durch Osteoblasten gebildete Geflechtknochen dient als erste knöcherne Überbrückung. Der harte Kallus wird schließlich in Phase vier durch Osteoklasten resorbiert und im letzten Schritt durch Lamellenknochen ersetzt<sup>11</sup>.

Knochen besitzt im Vergleich zu anderen Organsystemen eine sehr hohe Regenerationsfähigkeit<sup>9</sup>. Seine selbstständige Wiederherstellung wird jedoch von Faktoren wie dem Gesundheitszustand, dem Alter und der Lebensweise, aber auch von der Größe des Defektes beeinflusst<sup>12</sup>. So genannte „critical size defects“ (CSD`s) sind beispielsweise zu groß um selbstständig zu heilen. Von Schmitz et al. wurden diese CSD`s als kleinste intraossäre Wunde in einem bestimmten Knochen und einer bestimmten Tierart definiert, die während des gesamten Lebens des Tieres nicht spontan heilt<sup>13</sup>, und anhand verschiedener Tiermodelle in der Literatur beschrieben<sup>12-15</sup>. Die Dimensionen solcher CSD`s variieren jedoch stark in Abhängigkeit von der Tierart, den unterschiedlichen Knochen und ihrer Struktur<sup>16</sup>. Zur Überbrückung der CSD`s und zur Beschleunigung verschiedenster anderer Reparationsprozesse kann der Gebrauch von bioaktiven Gerüstmaterialien einen großen Gewinn darstellen<sup>16,17</sup> und selbst bei kleinen Defekten zwischen Erfolg und Misserfolg entscheiden. Geeignete Materialien können hierbei den Defekt füllen und gegebenenfalls stabilisieren, während positiv wirkende Stimuli die Zellaktivität und Proliferation begünstigen<sup>12</sup>. Obwohl der komplexe physiologische Mechanismus der Knochenheilung noch nicht vollständig entschlüsselt wurde, konnten bereits eine Vielzahl stimulierender Signalmoleküle identifiziert und ihre Wirkungsweise in der Knochenheilungskaskade beschrieben werden<sup>17</sup>.

## 1.4 Knochenersatzstoffe

Rueger unterteilt die Knochenersatzmittel nach Ausgangsverbindung bzw. Herstellungsverfahren in 4 Gruppen<sup>2</sup>:

### I. Biologisch, organische Materialien

- Knochenmatrizen und –extrakte
- Extrahierte Knochenwachstumsfaktoren (z. B. bovines BMP)
- Nicht knochenspezifische Substanzen (z.B. PGE, TGF- $\beta$ 1)

### II. Synthetische anorganische Materialien

- Kalziumphosphatkeramiken unterschiedlicher Stöchiometrie

### III. Synthetische organische Materialien

- Organische Polymere und deren Kombinationen

### IV Komposite

- Kombination von Substanzen der Klassen I, II und III

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Materialien gehören den Gruppen II und IV an.

### 1.4.1 Kalziumphosphatkeramiken als Knochenersatzstoffe

Eine wichtige Gruppe der synthetisch hergestellten Knochenimplantate stellen die Kalziumphosphatverbindungen dar, die 1920 das erste Mal zum klinischen Einsatz kamen<sup>18</sup>. Sie zeichnen sich durch eine große Ähnlichkeit zu Knochen, eine hohe Biokompatibilität sowie gute osteokonduktive Eigenschaften aus<sup>19</sup>. Neben der großen Gruppe der hydraulischen Zemente sind die Keramiken die am häufigsten in der Medizin eingesetzten Kalziumphosphate. Derzeit werden vor allem Hydroxylapatit (HA) ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) und  $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP) ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) als Keramiken eingesetzt. Beide sind biokompatibel, osteokonduktiv und bioresorbierbar<sup>20</sup>. Nach ihrer Implantation unterliegen sie in Abhängigkeit von Struktur und Materialbeschaffenheit einem chemisch-physikalischen Ab- bzw. Umbau, welcher maßgeblich von Faktoren wie Porösität, Kristallgröße und Verhalten in saurem Milieu beeinflusst wird<sup>19,21</sup>. Hydroxylapatit, das der mineralischen Hauptkomponente des Knochens entspricht<sup>19</sup>, wird hierbei mit einer vergleichsweise niedrigeren Löslichkeit deutlich langsamer resorbiert als  $\beta$ -TCP<sup>21-25</sup>, dessen Abbau schneller und häufig vor allem durch Makrophagen stattfindet<sup>26</sup>. Kommt es zur Situation, dass  $\beta$ -TCP schneller resorbiert wird als neuer Knochen entsteht<sup>27</sup>, kann dies entzündliche und anschließend bindegewebige

Reaktionen sowie mangelnde Knochenneubildung zur Folge haben<sup>2</sup>. Aus diesem Grund wird  $\beta$ -TCP oft mit weniger schnell resorbierbaren Materialien wie Hydroxylapatit kombiniert. Kommerziell werden Hydroxylapatit- und  $\beta$ -TCP Keramiken entweder einzeln oder in Kombination in fester oder poröser Form als Granulate oder Blöcke eingesetzt. Während Blöcke außerhalb des Körpers in die passende Form gebracht werden müssen und bei der Implantation, je nach Defektgeometrie, die Gefahr eines unvollständigen Knochen-Implantatkontaktes besteht<sup>28</sup>, können Granulate aus dem eigentlichen Defekt migrieren und besitzen eine vergleichsweise geringere mechanische Stabilität<sup>29</sup>. In poröser Form entspricht  $\beta$ -TCP in seiner Druck- und Zugkraft dem kortikalen Knochen<sup>22</sup>. Es kann aber, wie auch Hydroxylapatitkeramiken, unter dem Einfluss von Zugspannung und Scherkräften weich und brüchig werden<sup>30</sup>, was ihren Einsatz auf nicht tragende und mechanisch wenig belastete Bereiche beschränkt, bzw. eine stabilisierende Osteosynthese voraussetzt<sup>2</sup>. Seine Einsatzgebiete sind z. B. die Knochendefektauffüllung in der kranio-maxillofazialen<sup>31</sup> und Traumatologie, in der Orthopädie<sup>32</sup> oder in der Wirbelsäulenchirurgie. Hier konnte  $\beta$ -TCP unter anderem bei der posterolateralen Fusion gute Erfolge aufweisen<sup>33</sup>.

Die Fähigkeit zur Osteointegration und die osteokonduktiven Eigenschaften einer Keramik werden besonders durch die Porosität des Materials beeinflusst<sup>34</sup>, welche sich aus der Größe und der Anzahl der Poren in dem verwendeten Material ergeben. Interkonnektierende Makroporen schaffen die Bedingungen für das Einwandern von Zellen wie Osteoblasten und Osteoklasten, von Gewebe und nutritiven Stoffen sowie das Einsprossen von Gefäßen in das gesamte Implantat<sup>35,36</sup>. Das Vorhandensein von Mikroporen führt zu einer Erhöhung der Oberfläche und ermöglicht die Zirkulation von Körperflüssigkeiten. In mehreren Studien wurde die optimale Porengröße, -dichte und -interkonnektion diskutiert<sup>20,24,36-40</sup>. Schenk stellte einen optimalen knöchernen Einbau ab einer Porengröße von 100 $\mu$ m fest<sup>41</sup>. Böhner et al. empfahlen Porengrößen zwischen 200 $\mu$ m und 800 $\mu$ m abhängig von der Größe des Implantates<sup>24</sup>. Letztendlich konnten jedoch in Bezug auf Knochenneubildung und Implantatabbau keine großen Unterschiede bei Porengrößen zwischen 150 $\mu$ m und 1220 $\mu$ m entdeckt werden<sup>37</sup>. Lu et al. fanden heraus, dass Porenverbindungen ab einem Durchmesser von 50 $\mu$ m das Einwachsen von Gefäßen erlaubten, wobei bei resorbierbaren Materialien die Dichte der Poren und ihre Verbindungen untereinander wichtiger erschienen als ihre Anzahl<sup>36</sup>.

In dieser Studie wurden synthetisch hergestellte, sterilisierte chronOS-Zylinder verwendet, die aus 100%  $\beta$ -TCP bestanden und vollständig resorbierbar waren. Mit der

dreidimensionalen Struktur, einer 70%igen interkonnektiven Porosität, einer Porengröße zwischen 100µm und 500µm, einer dem kortikalen Knochen entsprechenden Druckkraft ( $7.5 \pm 1 \text{ MPa}$ ) und der Imprägnierung mit autologem venösen Blut haben die Keramiken bereits in vorangegangenen Studien ihre gute Einsetzbarkeit gezeigt<sup>16,42</sup>.

### 1.5 Biomimetische Substanzen

„Die Biomimetik ist eine Forschungsrichtung, die versucht, Materialien der belebten Natur für technische Zwecke zu kopieren und gegebenenfalls zu verfeinern“<sup>43</sup>. Unter biomimetischen Substanzen als Knochenersatzstoffe können demnach alle Stoffe zusammengefasst werden, die in irgendeiner Form den Knochenstoffwechsel mit dem Ziel einer verbesserten bzw. beschleunigten Knochenheilung beeinflussen. Je nach Substanz wirken sie dabei chemotaktisch, proliferativ, induktiv oder differenzierend<sup>2</sup>, lokal oder systemisch<sup>17</sup>. Neben der Kenntnis über die effektivste Dosis einer biomimetischen Substanz ist auch der ideale Applikationszeitpunkt von großer Bedeutung<sup>17</sup>, da bereits kleine Veränderungen eine Imbalance zwischen Knochenabbau und Neubildung verursachen können<sup>44</sup>.

#### 1.5.1 Hydroxyfasudil (Hy)

Hydroxyfasudil ist ein aktives Metabolit des Isoquinolinderivats Fasudil, das als eines der ersten kleinmolekularen Inhibitoren der Rho-Kinase (ROCK) identifiziert werden konnte<sup>45</sup>. Nach oraler Aufnahme wird Fasudil in der Leber zu Hydroxyfasudil metabolisiert<sup>46</sup>, welches als spezifischer selektiver Inhibitor die Konformation der ROCK verändert<sup>47</sup>. Die ROCK selbst ist eine Serin-Threonin-Protease, die in aktivierter Form als einer der wichtigsten Regulatoren verschiedener zellulärer Funktionen fungiert<sup>47-50</sup>. Es besteht der starke Verdacht, dass sie die Knochenbildung negativ reguliert<sup>51</sup>. Hydroxyfasudil hat als Hemmer der ROCK bereits in mehreren Studien seine positive Wirkung gezeigt, insbesondere bei vaskulären und ischämischen Erkrankungen<sup>52-55</sup>. Über seinen Einfluss auf die Knochenneubildung ist jedoch noch nicht viel bekannt. In einer von Ohnaka et al. durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass Hydroxyfasudil durch die spezifische Hemmung der ROCK die Bildung von bone morphogenic protein-2 (BMP-2) und Osteokalzin indirekt fördert. BMP-2 ist ein für den Knochenstoffwechsel wichtiges Glykoprotein, das zur Superfamilie der TGF-β gehört. Es induziert bekannter Weise die Differenzierung von Osteoblasten und die ektopische Knochenbildung<sup>56</sup>. Bei Osteokalzin handelt es sich um das wichtigste

nicht-kollagene Knochenmatrixprotein, das von reifen Osteoblasten gebildet wird und als Marker für die Differenzierung von Osteoblasten dient<sup>57</sup>. Die Wirkung von Hydroxyfasudil beruht auf einer Steigerung der Expression von BMP-2 mRNA um das 3.5fache und von Osteokalzin um das 9-12fache<sup>51</sup>. Ohnaka et al. stellte weiterhin fest, daß Hydroxyfasudil die gesenkte Expression von BMP-2 und Osteokalzin, die durch eine nanomolare Menge Dexamethason induziert worden war, wieder aufheben und sogar noch steigern konnte. Diese Entdeckung könnte von großem Interesse für die Bekämpfung der glukokortikoid-induzierten Osteoporose sein<sup>51</sup>.

### **1.5.2 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)**

Prostaglandine sind biologisch aktive, ungesättigte Fettsäuren, die lokal ausgeschüttet und sehr schnell metabolisiert werden<sup>58</sup>. Ihre Synthese erfolgt hauptsächlich über den Cyclooxygenase-Weg, bei dem Arachidonsäure aus Phosphorlipiden der Zellmembran freigesetzt und in weiteren Schritten in Prostaglandin umgewandelt wird. Grundsätzlich an der Entstehung von Entzündungen beteiligt, gibt es einige Prostaglandine, die auch entzündungshemmend wirken können<sup>58</sup>. Hierzu gehören die Prostaglandine der E Gruppe, welche die stärkste Wirkung auf den Knochenstoffwechsel haben<sup>59-62</sup>. Ihre komplexe Wirkungsweise wurde in den letzten drei Jahrzehnten kontrovers diskutiert und konnte bis heute aufgrund der sehr uneinheitlichen Untersuchungsmethoden<sup>58</sup> noch nicht vollständig und schlüssig definiert werden. Erste *in vitro* Studien gingen davon aus, dass Prostaglandine die Knochenresorption fördern<sup>63,64</sup>. Dabei wurden jedoch Testsysteme verwendet, die ausschließlich die Knochenresorption betrachteten. Spätere *in vivo* Studien zeigten hingegen deutlich, dass die Prostaglandine ebenfalls osteogenetische Fähigkeiten besitzen<sup>60,61</sup>. Eine erhöhte Knochenbildung und Knochenmasse konnte dabei in Abhängigkeit von Lokalisation und Spezies sowohl bei systemischer<sup>65-72</sup> als auch bei lokaler Prostaglandingabe<sup>60,73</sup> nachgewiesen werden, jedoch war die Knochenbildung dosisabhängig. Bei der lokalen Gabe zeigten beispielsweise niedrige Dosen eine lamelläre Knochenbildung, höhere Dosen die Bildung von Geflechtknochen. Zu hohe Prostaglandingaben führten hingegen eher zu Knochenresorption<sup>74,75</sup>. Die Schwellendosis für die Knochenbildung scheint allerdings um ein zehnfaches niedriger zu sein als die für Resorption, was einen spezifischen Einsatz möglich macht<sup>76</sup>. Dabei liegt der Vorteil einer lokalen Gabe in einer sehr viel geringeren Dosierung im mg Bereich<sup>58</sup>. Dies ist kostengünstiger und vermeidet systemische Nebenwirkungen wie z. B. Nasenbluten, Durchfall oder ein reduziertes

Skelettwachstum<sup>72</sup>. Heute wird davon ausgegangen, dass PGE<sub>2</sub> als wichtiger Regulator des Knochenmetabolismus grundsätzlich in der Lage ist, durch seinen Einfluss auf Osteoblasten sowohl Knochenbildung als auch -resorption zu modulieren<sup>77</sup>. Es wirkt auf Osteoblastenvorläufer und induziert deren Entwicklung zu knochenbildenden Osteoblasten, gleichzeitig stimuliert es aber auch reife Osteoblasten, die daraufhin Osteoklasten zur Knochenresorption veranlassen<sup>78</sup>. Dieser Mechanismus unterliegt einer strengen Regulation, die Interaktionen von osteoklastischen Vorläuferzellen mit Osteoblasten oder Stromalzellen beinhaltet<sup>59</sup>. PGE<sub>2</sub> vermittelt seine gewebespezifische pharmakologische Wirkung dabei über vier unterschiedlich wirkende G-Proteingekoppelte Rezeptorsubtypen: EP1, EP2, EP3, und EP4<sup>79</sup>. Die Wirkung auf das Knochengewebe wird mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Aktivierung der EP2 und EP4 Rezeptoren hervorgerufen, jedoch gibt es geteilte Meinungen darüber, welcher der beiden Rezeptoren hierfür ausschlaggebend ist<sup>78,80,81</sup>. Neuere Studien konnten mit Hilfe von EP-Rezeptor-knockout Tieren und selektiven EP- Rezeptor-Agonisten demonstrieren, dass EP4 und/oder EP2 sowohl die anabolen<sup>78,82</sup> als auch katabolen Wirkungsweisen von PGE<sub>2</sub><sup>83,84</sup> mediiieren. Beide Rezeptorsubtypen führen über eine Signalkaskade zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem 3'5 Adenosin Monophosphat (cAMP)<sup>79</sup>. Durch cAMP können daraufhin weitere Kaskaden induziert werden. Seine Erhöhung führt zur Expression von insulinlike growth factor-1 (IGF-1)<sup>85</sup>, einem Wachstumsfaktor, der spezifisch die Kollagensynthese durch Osteoblasten fördert<sup>86</sup>. In Bezug auf die Knochenresorption scheint die cAMP-abhängige Wirkung unterschiedlich zu sein. Einerseits konnten Okamoto et al. nachweisen, dass durch die cAMP- abhängige Aktivierung von Chloridkanälen eine reduzierte Osteoklastenmotilität und damit eine Hemmung der Knochenresorption bewirkt wird<sup>77</sup>, andererseits wird auch die Expression von osteoclast differentiation factor (ODF) in Osteoblasten und damit die Stimulation der Knochenresorption durch einen cAMP-abhängigen Mechanismus induziert<sup>83,84</sup>.

Trotz aller Unklarheiten, die noch über die Wirkungsweise von PGE<sub>2</sub> auf den Knochen bestehen, konnte doch festgestellt werden, dass es in niedrigen Dosen starke anabole Eigenschaften besitzt und mit dem Wissen um die richtige Dosis, Applikationsform und –länge erfolgreich bei einer Vielfalt klinischer Erkrankungen zur selektiven Förderung der Knochenheilung eingesetzt werden kann.



### 1.5.3 Autologe Biomimetika

Zur Verbesserung der reduzierten osteinduktiven Wirkung einer Keramik kann diese mit autologem Knochenmark, autologem Blut, angereicherten Zellkonzentraten oder einer Variation von Kompositen angereichert werden<sup>42,87</sup>. Knochenmark wie auch Blut haben bereits in verschiedenen klinischen Studien ihre Fähigkeit, die Knochenneubildung zu fördern, bewiesen<sup>16</sup>. Sie sind einfach und, bei richtiger Durchführung, mit geringen Risiken zu gewinnen, vergleichsweise kostengünstig und biologisch hochwertig<sup>42,87</sup>. Für die Erhöhung der osteogenetischen Aktivität spielen vor allem vom Knochenmark stammende Zellen wie osteoblastische Progenitorzellen und deren biologische Stimuli, Wachstumsfaktoren und Zytokine (BMPs, TGF- $\beta$ s, IGFs etc.), aber auch Endothelzellen und Entzündungszellen eine wichtige Rolle<sup>87</sup>. Die Effizienz hängt dabei einerseits von der Zellzahl<sup>88</sup>, andererseits vom Vorhandensein eines Fibringerinnsels ab, das physiologische Bedingungen im Implantat schafft<sup>42</sup>. Als Clot bezeichnet, gibt das Gerinnsel mechanische Stabilität, dient als Gerüst für implantierte osteogenetische Zellen und unterstützt das Anhaften und Einwandern von Zellen. Durch Degranulation von Thrombozyten bedingt es die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Fibrinolytische Aktivitäten innerhalb des Gerinnsels stellen zusätzlich angiogenetische Faktoren zur Verfügung<sup>87</sup>. Im Vergleich zu Blut und angereicherten Zellen besitzt Knochenmark dabei ein eindeutig höheres osteogenetisches Potential<sup>42</sup>.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Aufbau der Studie

Diese experimentelle chirurgische Studie wurde an 15 adulten, weiblichen Schafen durchgeführt. Als Versuchsmodell diente in leicht abgewandelter Form das „Drill hole model“<sup>89</sup>, indem jedem Tier 4 zylindrische Bohrdefekte gesetzt wurden, je ein Defekt im distalen Bereich des Femurs und proximalen Bereich der Tibia beider Hintergliedmaßen. Nach den anschließend eingesetzten Implantaten wurde eine Aufteilung in 5 Gruppen vorgenommen, wobei die erste Implantatgruppe unbehandelt war und die weiteren 4 Gruppen mit biomimetischen Substanzen in unterschiedlicher Konzentration versehen wurden. Unmittelbar nach der Operation wurde ein Kontrollröntgen durchgeführt. Die Schlachtung der Tiere erfolgte nach 8 Wochen. Nach einer makroskopischen Beurteilung der Knochen wurden diese erneut geröntgt und für die weiterführenden histologischen, histomorphometrischen, mikroradiographischen und Mikro CT-Untersuchungen vorbereitet.

**Tabelle 1: Überblick über die Versuchsanordnung**

Gruppe	Anzahl Tiere	Schaf- Nr.	Alter (J)	KGW (kg)	Schlachtung (Wo)
I	3	3701	5	83	8
		3702	5	56	
		3703	5	73	
II	3	3704	5	70	8
		3705	5	70	
		3706	5	68	
III	3	3707	5	68	8
		3708	5	65	
		3709	5	72	
IV	3	3710	5	58	8
		3711	4	68	
		3712	3.5	69	
V	3	3713	2	58	8
		3714	5	73	
		3715	5	72	

**Tabelle 2: Verteilung der Implantate**

Lokalisation/ Gruppe	I	II	III	IV	V
<b>Femur links</b>	chronOs unbehandelt	ProstaglandinE <sub>2</sub> 1µM	ProstaglandinE <sub>2</sub> 50µM	Hydroxyfasudil 10µM	Hydroxyfasudil 100µM
<b>Femur rechts</b>	chronOs unbehandelt	ProstaglandinE <sub>2</sub> 1µM	ProstaglandinE <sub>2</sub> 50µM	Hydroxyfasudil 10µM	Hydroxyfasudil 100µM
<b>Tibia links</b>	chronOs unbehandelt	ProstaglandinE <sub>2</sub> 1µM	ProstaglandinE <sub>2</sub> 50µM	Hydroxyfasudil 10µM	Hydroxyfasudil 100µM
<b>Tibia rechts</b>	chronOs unbehandelt	ProstaglandinE <sub>2</sub> 1µM	ProstaglandinE <sub>2</sub> 50µM	Hydroxyfasudil 10µM	Hydroxyfasudil 100µM

*chronOS: Knochenersatzmaterial aus Trikalziumphosphat*

## 2.2 Implantatherstellung und Vorbereitung

Für die Herstellung der Implantate wurden chronOS-Blöcke der Firma Synthes Oberdorf, Schweiz verwendet. Es handelte sich hierbei um standardisiert hergestellte Rohlinge aus 100%  $\beta$ -Trikalzium-Phosphat mit interkonnektierenden Poren, die einen Porendurchmesser von 100-500µm (Makroporen) und 10µm (Mikroporen) hatten. Um die passenden zylinderförmigen Blöcke mit einem Durchmesser von 8mm und einer Höhe von 13mm zu erhalten, wurden die Rohlinge speziell zugeschnitten. Zur Imprägnierung mit PGE<sub>2</sub> und Hydroxyfasudil in den verschiedenen Konzentrationen wurde die Blöcke einzeln in einen Eppendorf Tube mit ca. 800µl der jeweiligen Lösung verbracht und über 4 Stunden in der Lösung gebadet. Anschließend wurden sie mit sterilen Stecknadeln herausgenommen, an Magneten aufgehängt und über einen Zeitraum von 20 Stunden getrocknet und dann verpackt. Der gesamte Herstellungsprozess erfolgte unter sterilen Bedingungen.

## 2.3 Tierversuch

Dieser Versuch wurde von dem kantonalen Veterinäramt Zürich mit der Bewilligungsnummer 194/2006 nach Art.13a des Eidg. Tierschutzgesetzes, TSchG; und Art. 60 bis 62 Eidg. Tierschutzverordnung, TSchV am 24.11.2006 genehmigt.

## 2.4 Tiere

Die Studie wurde mit 15 adulten (4-5 Jahre alten), weiblichen Schweizer Alpenschafen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 68kg (56-83kg) durchgeführt. Alle Tiere durchliefen eine Ankaufsuntersuchung, eine antiparasitäre Behandlung mit Doramectin i. m. (0,2 mg/kg; Dectomax; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) und Netobimin p. o.

(4ml/10kg; Hapadex 5%; Essex Tierarznei, Lyssach, Schweiz) nach einem an die Befallssituation angepassten Behandlungsplan, regelmäßige Impfungen gegen Clostridien- und Pasteurelleninfektionen (2ml/Tier; Ovilis Heptavac P; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) und eine Ultraschalluntersuchung zum Ausschluss trächtiger Tiere, die, bei negativem Ergebnis, eine zweimaligen Gabe von Dinoprost i.m. (1mg/Schaf; Dinolytic; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) zur Verhütung einer Trächtigkeit im Abstand von 14 Tagen beinhaltete. Den Tieren wurde weiterhin mit einem Vacutainer System (Bellvier Industrial Estate, Plymouth, GB) Blut entnommen und serologisch auf Maedi-Visna untersucht (Virologisches Institut, Tierspital Bern). Sie erhielten bestandseigene Ohrmarken und wurden regelmäßig geschoren und einer Klauenpflege unterzogen. 14 Tage vor der Operation wurden sie in den näher gelegenen Strickhofstall gebracht, wo ihnen nochmals Blut für eine blutchemische und hämatologische Untersuchung entnommen und eine erneute klinische Untersuchung mit Herz- und Lungenauskultation durchgeführt wurde, um mögliche Operationsrisiken auszuschließen. 24 Stunden vor der Operation wurde den Tieren das Futter entzogen, wobei sie freien Zugang zu Wasser hatten. Sie wurden gewogen und im Bereich der Operationsstelle sowie an der rechten Halsseite großzügig ausgeshoren.

### **2.5 Vorbereitung und Anästhesie**

Am Tag der Operation wurden die Schafe vom Anästhesisten noch einmal auskultatorisch untersucht und erhielten daraufhin eine analgetische und sedative Prämedikation mit Xylazin (0,1mg/kg, Rompun<sup>®</sup> 2%ige Lösung, Bayer Heath Care, Lyssach, Schweiz) und Buprenorphin (0,01g/kg, Temgesic<sup>®</sup>, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz). Nach ca. 30 Minuten wurden sie in den Operationssaal verbracht, wo ihnen, nach steriler Vorbereitung mit desinfizierender Hibiscrub-Seife (SSL Healthcare Schweiz AG, Pratteln, Schweiz), 80%-igem Alkohol und Hibitane<sup>®</sup> (G.Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz), ein venöser Zugang in Form eines Venenverweilkatheters (Vygonüle S<sup>®</sup>14G; Vygon GmbH; Aachen, Deutschland) in die Vena jugularis gelegt wurde. Als Verschlussvorrichtung diente ein IN-Stopper (Braun Melsungen AG; Deutschland). Die Fixation des Katheters erfolgte mit einem nicht resorbierbaren Nahtmaterial (Supramid 2/0; Aesculap AG&Co, Tuttlingen, Deutschland). Den Tieren wurde daraufhin präoperativ eine antibiotische und analgetische Medikation mit Benzylpenizillin i.v. (30000 I.U./kg, Procain-Penicillin Streuli ad us. vet., G. Streuli&Co AG; Uznach, Schweiz), Gentamicin i.v. (6mg/kg; Vetagent<sup>®</sup> ad us. vet.,

Veterinaria AG, Zürich, Schweiz), Carprofen i.v. (4mg/kg; Rimadyl®; Pfizer, Vertrieb Dr. Gräub AG, Bern, Schweiz), sowie eine Tetanusprophylaxe s.c. (3000I.E./Tier, Tetanusserum Intervet ad us. vet.; Vertrieb Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) verabreicht. Zur Narkoseeinleitung wurde Ketamin (2mg/kg; Narketan®, Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Diazepam (0,1mg/kg i.v.; Valium®, Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz) und, bei Bedarf, 2-4mg/kg Propofol i.v. verwendet. Die Tiere wurden, nach lokaler Anästhesie des Kehlkopfes mit einem Sprühstoß Lidocain (entspricht ca. 10mg, Xylocain® Spray, Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz), mit einem Endotrachealtubus der Größe 10-12 intubiert und auf den Tisch gelegt. Hier wurde die Narkose als Inhalationsnarkose mit 1-1,5% Isofluran (Forene®, Abbot AG, Baar, Schweiz) aufrecht erhalten. Zur kontinuierlichen Blutdruckmessung während der Operation wurde ein arterieller Ohrkatheter verwendet. Des Weiteren erhielten die Tiere ein Monitoring durch Pulsoxymetrie und Capnographie sowie Ringer-Lösung (10ml/kg/h) als Infusion über die gesamte Dauer der Operation. Sie wurden in seitlicher Brustlage mit einer Seitwärtsdrehung im Lendenwirbelbereich nach rechts positioniert, wobei die linke Hintergliedmaße leicht angewinkelt auf dem Operationstisch lag und die rechte ebenfalls angewinkelte Hintergliedmaße im 90° Winkel dazu an einem Haltestab befestigt wurde (Abb. 2). Das Operationsfeld wurde daran anschließend aseptisch mit Hibiscrub (SSL Healthcare Schweiz AG, Pratteln, Schweiz), 80%-igem Alkohol und Hibitane® (G.Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) vorbereitet.

## **2.6 Operation**

Alle Tiere wurden standardmäßig und unter gleichen Bedingungen operiert. Die Bohrlochdefekte wurden an beiden Hintergliedmaßen im distalen Bereich des Femurs (Condylus medialis) und dort am proximalen Ende des Ligamentum collaterale mediale und im proximalen Bereich der Tuberositas Tibiae, direkt kranial vor dem distalen Ansatz des Seitenbandes gesetzt. Der Zugang erfolgte von medial mit einem ca. 12 cm langen Hautschnitt, der von proximal des medialen Condylus des Femurs bis zur proximalen Metaphyse der Tibia reichte. Im Anschluss daran erfolgte die Präparation der Weichteile direkt über dem medialen Seitenband des Kniegelenkes durch Spaltung der Faszia und einem Teil des distalen Sehnenansatzes des Musculus vastus medialis bis auf den Knochen, wobei die Wunde mit Wundspreizern offen gehalten wurde. Nach Festlegen der Bohrstellen wurde in diesem Bereich das Periost inzidiert und mit einem

Periostschaber retrahiert. Anschließend erfolgte die Bohrung mit einer luftdruckbetriebenen Bohrmaschine (Synthes, Oberdorf, Schweiz) und einem speziell angefertigten 8mm Bohrer mit abgeflachter Spitze und einer Gewebeschutzhülse. Der zylindrische Bohrdefekt wurde unter Kühlung mit steriler Kochsalzlösung senkrecht zur Knochenachse gesetzt. Eine am Bohrer angebrachte Arretierung gewährleistete dabei bei jeder Bohrung eine Eindringtiefe von 13mm (Abb. 3). Das Bohrloch wurde daraufhin mit Tupfern gesäubert und trocken gehalten. Vor ihrer Insertion wurden die 4 zylindrischen Knochenimplantate unter sterilen Bedingungen in eine 10ml Spritze ohne Kolben gegeben, die mit einem Finger am Konus verschlossen wurde. Die Spritze wurde daraufhin mit 1-2ml frisch gewonnenem arteriellem Blut zur vollständigen Perfusion der Implantate befüllt (Abb. 4). Hierfür wurde der Spritzenstempel wieder aufgesetzt und, nach Ablassen der sich in der Spritze befindlichen Luft, kontinuierlich hin- und herbewegt, um einen Unterdruck aufzubauen. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur soviel Blut perfundierte, wie das Implantat aufnehmen konnte, um keine Auswaschungen der biomimetischen Substanzen zu riskieren. Die Implantate wurden daraufhin aus der Spritze herausgenommen und es erfolgte die Insertion der Knochenimplantate mit einem speziell in dieser Größe angefertigten Stößel (Synthes, Oberdorf, Schweiz) und einem Hammer (Synthes, Oberdorf, Schweiz), der mit leichten Schlägen eine gleichmäßige Versenkung ermöglichte (Abb. 5 und 6). Nach dem Setzen der Implantate und einer fotografischen Dokumentation (Abb. 7) wurde die Muskulatur wieder zurückverlagert und anschließend, wie die Unterhaut, mit resorbierbarem Faden (Vicryl® 2/0; Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgien) adaptiert. Der Verschluss der Haut erfolgte mit Staples (Davis&Geck Appose ULC®, Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland). Um die Wunde direkt nach der Operation zu schützen, wurde auf der Haut ebenfalls mit Hilfe von Staples eine sterile Gaze angebracht. Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere mit projektbezogenen Ohrmarken mit den Nummern 3701-3715 und einem Mikrochip (DATAMARS SA, RF-Identification Technology, Bedano-Lugano, Schweiz), der subkutan auf der linken Halsseite angebracht wurde, gekennzeichnet. Es wurde dann von beiden Hintergliedmaßen je eine kranio-kaudale und medio-laterale Röntgenaufnahme gemacht (Abb. 8).

Nach Extubation wurden die Tiere in eine mit Sägespänen eingestreute Box verbracht und in der Aufwachphase überwacht. Hier verblieben sie die ersten 24 Stunden bei freiem Zugang zu Heu und Wasser. Anschließend wurden sie für die postoperative

Behandlungszeit in einem größeren Stall gemeinsam aufgestellt, wo sie zweimal täglich kontrolliert und klinisch untersucht wurden und über einen Zeitraum von 4 Tagen eine antibiotische Behandlung mit Penicillin und Gentamycin sowie eine analgetische und antiphlogistische Behandlung mit Carprofen erhielten. Am Tag der Operation wurde ihnen zusätzlich 3x im Abstand von 4 Stunden Buprenorphin i.m. (0,01mg/kg) als Schmerztherapie verabreicht. Das Entfernen der Tupfer erfolgte nach 4 Tagen, das der Staples nach ca. 14 Tagen. Die Tiere wurden dann, soweit sie klinisch gesund und die Operationsstellen entsprechend verheilt waren, bis kurz vor ihrer Schlachtung in den eine Stunde entfernten Staffelegghof transportiert, wo sie tagsüber Weidegang hatten, täglich kontrolliert und mindestens einmal wöchentlich klinisch untersucht wurden.

### 3 Evaluation

#### 3.1 Probengewinnung und Aufbereitung

Alle Schafe wurden 8 Wochen nach der Operation geschlachtet. Sie wurden hierzu im Tierspital eigenen Schlachthof durch Bolzenschuss betäubt und entblutet. Nach beidseitiger Entnahme von Femur und Tibia wurden diese freipräpariert und die Implantatstellen soweit als möglich freigelegt, adspektorisch und palpatorisch untersucht und fotografiert. Im Anschluss daran wurden Röntgenaufnahmen der Implantate im Knochen mit dem Faxitron (Faxitron X-Ray System, Hewlett&Packard, Mc Minville Division, Oregon,USA) in zwei Ebenen angefertigt. Die Implantatstellen wurden dann mit einer Bandsäge (Kolbe Maschinenteknik GmbH, Elchingen, Deutschland) als ca. 2x2cm große Würfel parallel zur Längsachse der Implantate herausgesägt. Das Probenmaterial wurde anschließend in beschrifteten Gläsern für 7 Tage in 4% Formalin fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%,70%,80%,90%,96%) entwässert. Im 70% Alkohol wurde eine Unterbrechung vorgenommen, in der die Proben in das „Institute for Biomechanics“ der ETH Zürich verbracht und die Mikro CT-Aufnahmen durchgeführt wurden. Anschließend folgte wieder am Tierspitallabor die weitere Entwässerung der Proben und die Entfettung mit Xylol in einem Vakuum. Nach zweimaligem Wechseln des Xylols wurden die Proben für sieben Tage bei 4 °C und ebenfalls unter Vakuum zur Durchtränkung des Gewebes in flüssige Methylmetacrylatlösung verbracht. Die Herstellung des Methylmetacrylats in einem Magnetrührer erfolgte nach einem festgelegten Schema. Hierbei wurden Methacrylsäuremethylester (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) in einem Verhältnis von 89.5:10:0.5 für 15 Minuten zusammengemischt. Die Proben wurden daraufhin zur Polymerisation in luftdichte Teflonformen gegeben, mit Methylmetacrylat übergossen und bis zur vollständigen Aushärtung bei Zimmertemperatur (22-24°C) im Wasserbad belassen. Nach Aushärten der Probenblöcke wurden diese mit Plastikaufsätzen beklebt (Historesinplastikkleber, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) und neu beschriftet. Zur histologischen und histomorphometrischen Beurteilung wurden Dickschnitte (ca. 40µm) und Dünnschnitte (ca. 5µm) hergestellt.



Zur Anfertigung der Dickschnitte wurden mit einer Innenlochsäge (Leica® SP1600, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) 300-400µm dicke Scheiben senkrecht zur Implantatlängsachse gesägt. Für die Femurschnitte wurde hierbei die Mitte des Implantates mit 6mm gewählt, das Schneiden der Tibiaschnitte erfolgte hingegen bereits bei einer Tiefe von 3mm, um sicher zu stellen, dass sie von Knochen umgeben waren. Vor der Weiterverarbeitung wurden diese Scheiben mit dem Faxitron (Faxitron X-Ray Systems, Hewlett Packard, Mc Minville Division, Oregon, USA) zur lückenlosen Dokumentation nochmals geröntgt. Anschließend wurden die Scheiben mit Kunststoffkleber (Cementit® CA 12, Merz + Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf Akropalobjektträger (Pespex GS 3mm, Wachendorf Ag Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) geklebt und mit Hilfe einer Schleif- und Poliermaschine (Exakt Mikroschleifsystem, Stuers A/S, Rodovre, Dänemark) auf eine Dicke von 40µm geschliffen, mit Toluidinblau gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt.

Die Anfertigung der Dünnschnitte erfolgte, nachdem sie zunächst angeschliffen wurden, mit einem Schnittmikrotom (Leica® RM 2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Schnitte von ca. 5µm wurden auf einen mit Chromgelatine beschichteten Objektträger aufgezogen, mit einer Kisolfolie bedeckt und bei 42°C 2 Tage lang im Wärmeschränk getrocknet. Jeweils ein Dünnschnitt wurde dann mit Toluidinblau, van Kossa Versilberung und mit einer McNeal Tetrachrom Gegenfärbung gefärbt und schließlich lichtmikroskopisch beurteilt. Bei 20 der insgesamt 56 Probenblöcke hatte die Durchtränkung des Gewebes in der Methylmetacrylatlösung nicht vollständig stattgefunden, was dazu führte, dass die Blöcke zu trocken waren, um mit dem Schnittmikrotom zu Dünnschnitten geschnitten zu werden. Diese Proben wurden daraufhin erneut eingebettet. Dazu wurden sie über 7 Tage in Azeton aufgelöst und gelangten dann über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%) wieder in den 90% Alkohol. Von hier aus durchliefen sie noch einmal die aufsteigende Alkoholreihe und ihre Folgeschritte bis zur erneuten Herstellung von Dünnschnitten.

### **3.2 Makroskopische Evaluation**

Die makroskopische Beurteilung der Knochen erfolgte adspektorisch und palpatorisch. Untersucht wurden Veränderungen des Weichteilgewebes um die Implantatstelle, Farb- und Strukturveränderungen des Knochens sowie Integration und Sitz des Implantats. Mit einer Digitalkamera wurden Bilder der Implantatstellen fotografisch festgehalten.

### **3.3 Radiologische und mikroradiologische Evaluation**

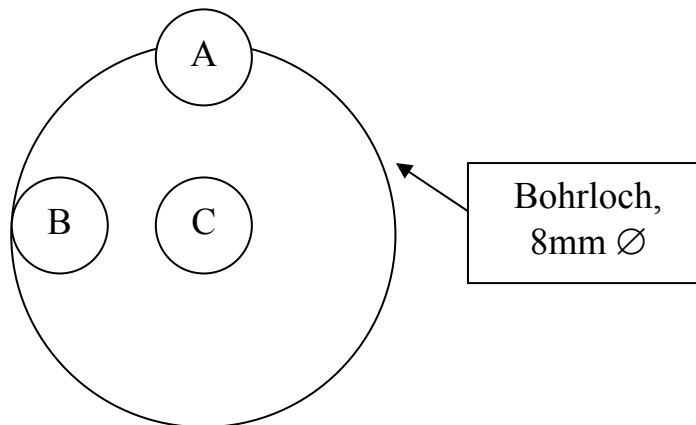
Die direkt nach der Operation durchgeführten kranio-kaudalen und medio-lateralen Röntgenaufnahmen dienten vor allem der Überprüfung der Lokalisation des Bohrlochs und der Integrität der Implantate. Die nach der Schlachtung angefertigten Röntgenbilder im kranio-kaudalen und medio-lateralen Strahlengang im Faxitron (55kVp, 5s, Faxitron X-Ray System, Hewlett Packard, Mc Minville Division, Oregon,USA) sowie die Mikroradiographien der Dickschnitte im Faxitron (27kVp, 11s, Faxitron X-Ray System, Hewlett Packard, Mc Minville Division, Oregon,USA), die auf einem Kodak Photo Film ( Kodak PP-L, Rochester, New York, USA) festgehalten wurden, dienten der lückenlosen Dokumentation.

### **3.4 Histomorphometrische Evaluation**

Zur Auswertung der mit Toluidinblau gefärbten Dickschnitte wurden diese in einer Vergrößerung von 0,5x10 mit einem Makroskop (Leica<sup>®</sup> M420, Leica-Microsystems, Glattbrugg, Schweiz) mit angeschlossener Digitalkamera abfotografiert. Unter Verwendung von Adobe Photoshop wurde daraufhin eine Schablone mit dem Durchmesser von 8mm angefertigt, über den abgebildeten Bohrlochbereich gelegt und die unterschiedlichen Komponenten innerhalb dieses festgelegten Bereiches angefärbt. Neu gebildete Knochenmatrix, Bindegewebe, Biomaterial und die Leerflächen zwischen Knochentrabekeln und Biomaterial erhielten dabei jeweils eine andere Farbe. Die quantitative Messung der Farben, d.h. der jeweiligen Komponenten im Bereich des Bohrlochs, erfolgte durch ein Bildanalyseprogramm (Leica<sup>®</sup> QWin). Anschließend wurden die erhaltenen Werte mit Microsoft Excel in Prozentanteile umgerechnet.

### **3.5 Histologische Evaluation**

Für die histologische Auswertung der Dünnschnitte wurden drei für das Implantat repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt und mit einer Objektivgröße von 20 lichtmikroskopisch ausgewertet. Gesichtsfeld A befand sich am Übergang vom Knochen zum Implantat, Gesichtsfeld B am Rand und Gesichtsfeld C in der Mitte des abgebildeten Bohrlochs (Abb. 1).

**Abb. 1: Gesichtsfelder der histologischen Untersuchung**

Bohrloch,  
8mm Ø

Alle Proben wurden sowohl in der Toluidinblau- Färbung und der Gegenfärbung nach Mc Neal als auch in der van Kossa-Färbung beurteilt.

Die Bewertung der Dünnschnitte erfolgte semiquantitativ unter Verwendung eines Scoring- Systems (Tab. 3 und 4). Die Proteoglykan –Färbung, als Hinweis für enchondrale Ossifikation, wurde in den Gesichtsfeldern A, B, und C unter Verwendung der Scoringtabelle 3 semiquantitativ beurteilt. Das Vorhandensein von Zellen in der Mitte des Implantates wurde mit Hilfe des Gesichtsfeldes C und der Tabelle 4 ermittelt.

**Tabelle 3: Proteoglykane in %**

Score	0	1	2	3
Proteoglykane/Knochen	0	<20	<50	>50

**Tabelle 4: Zellen in der Mitte des Implantates**

Score	0	1
Zellen	nein	ja

Eine differenzierte Auswertung der Zellen war nicht möglich. Auch nach der erneuten Einbettung eines Teils der Proben ließ die verminderte Qualität der Histologieschnitte eine durchgehend gleichmäßige Typifizierung der Zellen innerhalb der Implantate nicht zu. Bei den auswertbaren Proben fanden sich im Inneren der Implantate auftretende Fibrinclots, welche, in Verbindung mit der Konsistenz des Biomaterials, das Schneiden der Histologieschnitte stark erschwerten. Das Biomaterial selbst konnte nicht infiltriert

werden, sodass es beim Schneiden zerbröckelte und teilweise im Gewebe verhaftet übereinander geschichtet wurde, was die Qualität der Dünnschnitte negativ beeinflusste. Eine standardisierte Zellidentifizierung war daher nicht sinnvoll.

### **3.6 Computertomographische Evaluation**

Das in dieser Studie verwendete Mikro –Computertomogramm ( $\mu$ CT 40, Scanco Medical AG, Bassersdorf, Switzerland) war mit einem  $5\mu\text{m}$  Röntgenröhrenbrennfleck als Quelle ausgestattet. Ein zweidimensionaler CCD (ladungsgekoppelter Speicher), der an einen als Detektor fungierenden Szintillator gekoppelt wurde, ermöglichte die parallele Erfassung von 20 computertomographischen Bildern. Die Röntgenröhre wurde mit 70kVp, 160  $\mu\text{A}$  und einer integrierten Zeitspanne von 200ms betrieben. Die Bilder wurden mit einer isotropischen, nominalen Auflösung von  $30\mu\text{m}$  (mittlerer Auflösungsmodus) aufgenommen. Im Durchschnitt wurde ein Volumen von  $19.8\text{mm}^3$  pro Probe bemessen, was eine Aufnahmezeit von 3 Stunden ergab.

Das Volumen von Interesse (VOI) wurde durch eine zylindrische Abgrenzung innerhalb des Defektes definiert und hatte bei den Femurproben einen Durchmesser von 8mm und eine Länge von 9mm. Bei den Tibiaproben betrug der Durchmesser des VOI 8mm und seine Länge 3mm. Es wurde ein begrenzter 3D Gauss Filter ( $\sigma = 1.2$ , Unterstützung von einem Voxel) verwendet, um die Störanfälligkeit in den berechneten Volumen teilweise zu verhindern<sup>90</sup>. Des Weiteren wurde durch eine globale „Thresholding Methode“ mineralisiertes Gewebe und Parenchym aufgeteilt<sup>91</sup>. Die Threshold-Werte wurden auf 22.4% des Maximalwertes der Grauskala festgesetzt. Morphometrische Kennziffern wurden festgelegt indem eine direkte 3D Einstellung in dem definierten Analysebereich verwendet wurde. Sie beinhalteten die Dichte des Knochenvolumens (BV/TV), die trabekuläre Dicke (Tb.Th), den trabekulären Abstand (Tb.Sp), die Anzahl der Trabekel (Tb.N) und die Konnektivitätsdichte (Conn.D).

### **3.7 Statistik**

Alle erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des Computerprogrammes SPSS 13.0 für MacIntosh X10 ausgewertet. Hierbei wurden die Histomorphometriedaten mit einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) geprüft. Aus den Ergebnissen der Histomorphometrie wurden mittels deskriptiver Statistik Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen

Gruppen wurden mit dem Post-hoc-Test nach Bonferroni errechnet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $< 0,05$  angesehen.

### **3.8 Evaluation der Konzentrationen der biomimetischen Substanzen**

Parallel zum Versuch wurden in der Firma Synthes Oberdorf, Schweiz chronOS-Blöcke auf die tatsächlich in ihnen enthaltenen Konzentrationen an biomimetischen Substanzen getestet. Dies wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitstomographie (HPLC) durchgeführt, mit der Substanzen getrennt und über Standards identifiziert und quantifiziert werden, um ihre genaue Konzentration zu ermitteln. Das HPCL ist ein chromatographisches Trennsystem, bei dem die zu untersuchende Substanz gemeinsam mit einem Laufmittel (mobile Phase) durch eine Trennsäule mit der enthaltenen stationären Phase gepumpt wird. Je nach Stärke der Wechselwirkungen bestimmter Bestandteile der zu untersuchenden Substanzen, erscheinen diese zu unterschiedlichen Zeiten (Retentionszeiten) am Ende der Trennsäule, wo sie schließlich mittels geeigneter Detektoren nachwiesen werden können.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Operation**

Außer bei einem Tier gab es keine Komplikationen bei der Operation. Bei Schaf 3712 wurde das Tibiofemoralgelenk eröffnet, konnte jedoch mit einem Einzelheft wieder verschlossen werden. Das Einsetzen der Implantate erfolgte bei allen Tieren ohne Schwierigkeiten. Die Implantationsstellen waren ohne Ausnahme gut sichtbar und wurden nach dem Einsetzen fotografisch festgehalten. Bei den Narkosen und der anschließenden Aufwachphase gab es keine Zwischenfälle.

### **4.2 Postoperative Phase**

Bei drei Tieren verlief die Heilung komplikationslos, bei den anderen Tieren kam es jedoch nach der Operation zu Lahmheiten und der Bildung von geringgradigen Seromen im Wundbereich. Diese Tiere wurden daraufhin in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Serome bildeten sich bei fast allen Tieren nach 2 bis 3 Wochen wieder selbstständig zurück. Schaf 3711 entwickelte am rechten Hinterbein im Nahtbereich eine eitrige Infektion, die jedoch nach 3 Tagen mit einer zweimal täglich durchgeführten Wundtoilette mit Hibitane® (G.Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) und Chlor-Tetracyclin-Spray (Werner Stricker AG, Zollikhofen, Schweiz) wieder gut abheilte. Auch bei Schaf 3714 traten eitrige Entzündungen an beiden Hinterbeinen auf. Hinzu kam eine starke Reaktion auf den Faden der Intrakutannaht, der nach und nach abgestoßen wurde. Dadurch verschlechterte sich der Allgemeinzustand des Tieres, es bildeten sich hochgradige Serome, die Wundnähte brachen, vor allem im rechten proximalen Bereich, auf und es entwickelten sich hochgradig eitrige Entzündungen. Das Schaf erhielt über 2 Wochen zwei- bis dreimal täglich eine Wundtoilette und über 10 Tage das Antibiotikum Amoxicillin (0,05ml/kg s.c., Clamoxyl®, Pfizer AG, Zürich, Schweiz). Nachdem sich sein Zustand aber nicht verbesserte, wurde es schließlich frühzeitig aus dem weiteren Versuch ausgeschlossen. Schaf 3707 und 3708 zeigten eine mittelgradige Lahmheit hinten links, die sich in den zwei Monaten bis zum Schlachttermin noch verstärkte. Bei den übrigen Tieren verlief die postoperative Phase bis zur Schlachtung nach 8 Wochen komplikationslos.

### **4.3 Makroskopische Resultate**

Bis auf 6 Implantate im Femur waren bei der makroskopischen Beurteilung der Knochen alle Implantate sichtbar und gut in das umliegende Knochengewebe integriert (Abb. 9). Um mehr als ein Drittel der Implantatstellen waren mittel- bis hochgradige Verwachsungen des umliegenden Bindegewebes festzustellen, die das Freipräparieren und die genaue Identifikation des Implantatsitzes erschwerten. Hierbei waren bei allen Gruppen insbesondere die Implantatstellen in der Tibia betroffen. Weiterhin waren nicht alle Tibiaimplantate direkt kranial vor dem distalen Ansatz des Seitenbandes gesetzt worden. Sie befanden sich jedoch stets im unteren Drittel des Seitenbandes. Die Proben 3706 FR, 3707 FL und 3708 FR wurden jeweils in die proximale Tibia anstatt in den Femucondylus gesetzt. Des Weiteren war bei den Proben 3707 FL und 3708 FL zu erkennen, dass bei der Bohrung auch die jeweiligen Gelenke miteröffnet worden waren. Das Weichteil-, Knochen- und Knorpelgewebe um diese Implantate zeigten mittelgradige Entzündungsreaktionen. Die Proben 3707FL und 3708FL wurden daraufhin von der histomorphometrischen und histologischen Auswertung ausgeschlossen.

### **4.4 Radiologische und mikroradiologische Resultate**

Alle Röntgenbilder wiesen auf eine gute Osteointegration der Implantate hin (Abb. 10 und 11). Da keine schwerwiegenden Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festzustellen war, wurde auf eine gesonderte Auswertung der Röntgenbilder verzichtet. Die Bilder bestätigten die bereits makroskopisch festgestellten falschen Implantat-Lokalisationen bei den Tieren 3706, 3707 und 3708, sowie die Gelenkeröffnung bei den Schafen 3707 und 3708.

### **4.5 Histomorphometrische Resultate**

Die Zusammensetzung der Komponenten Knochen, Bindegewebe und Biomaterial innerhalb des Bohrlochs (Abb. 12-17) wurden in Tabelle 5 dargestellt. Es zeigten sich hierbei bei allen drei Parametern statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

**Tabelle 5: Statistische Ergebnisse der Histomorphometrie**

Gruppe	% Knochen	% Implantat	% BGW
<b>I</b> Femur control plain	28.44 ± 5.2	32.30 ± 8.6	39.26 ± 5.7
Tibia control plain	28.75 ± 13.4	40.91 ± 11.4	30.33 ± 10.0
Total control plain	28.61 ± 10.0	37.00 ± 10.7	34.39 ± 9.2
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	31.53 ± 9.2	38.45 ± 12.3	30.02 ± 12.3
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	25.77 ± 11.6	48.07 ± 8.9	26.15 ± 12.7
Total PGE <sub>2</sub> 1	28.39 ± 10.5	43.70 ± 11.2	27.91 ± 12.0
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	36.30 ± 3.9	26.03 ± 4.7	37.66 ± 7.2
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	44.02 ± 9.7	34.29 ± 11.0	21.67 ± 8.3
Total PGE <sub>2</sub> 50	40.94 ± 8.6	30.99 ± 9.6	28.10 ± 11.1
<b>IV</b> Femur Hy 10	39.17 ± 4.7	27.29 ± 4.3	33.53 ± 6.5
Tibia Hy 10	37.74 ± 6.7	39.77 ± 9.7	22.48 ± 10.4
Total Hy 10	38.39 ± 5.6	34.10 ± 9.8	27.50 ± 10.2
<b>V</b> Femur Hy 100	31.07 ± 12.7	35.46 ± 8.7	33.47 ± 5.9
Tibia Hy 100	35.30 ± 16.0	40.43 ± 12.6	24.26 ± 11.2
Total Hy 100	33.19 ± 13.5	37.94 ± 10.4	28.86 ± 9.6

Mittelwerte ± Standardabweichung in %

#### 4.5.1 Knochenbildung

Bei der gemeinsamen Untersuchung der Femur- und Tibiaproben wurde mit deutlichem Abstand die höchste Knochenneubildung bei Gruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) festgestellt, gefolgt von den Gruppen IV und V. Am wenigsten Knochenneubildung war bei den Gruppen I und II festzustellen. In der Gesamtbetrachtung waren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu verzeichnen (p=0.012). Auch die individuelle Untersuchung der einzelnen Gruppen ergab mit einem Wert von p=0.050 statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppe II und III. Zwischen Gruppe III und I wurden sie knapp verfehlt (p=0.057).

Bei der getrennten Betrachtung der Femur- und Tibiagruppen fiel auf, dass die Ergebnisse der Tibiagruppen teilweise tiefer, v.a. in Gruppe III aber sehr viel höher ausfielen als die der Femurgruppen. Des Weiteren bildete sich bei den Femurgruppen in Gruppe IV (Hy 10) am meisten neuer Knochen. Es folgten Gruppe III, II und V gefolgt von der Kontrollgruppe, die auch hier die geringste Knochenneubildung aufwies. Statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gab es bei getrennter Betrachtung allerdings nicht (p>0.05).



Sowohl zwischen Knochen- und Biomaterialanteil als auch zwischen Knochen- und Bindegewebeanteil waren negative Korrelationen festzustellen ( $p=0.000$ ).

#### **4.5.2 Bindegewebe**

Den höchsten Bindegewebeanteil hatte bei der gemeinsamen Untersuchung die Kontrollgruppe gefolgt von Gruppe V und Gruppe III. Die niedrigsten Werte wiesen Gruppe II und Gruppe IV auf.

Bei der getrennten Untersuchung der Femur- und Tibiagruppen zeigte sich, dass es bei der gesamthaften Differenz zwischen den Gruppen mit einem Wert von  $p=0.050$  statistisch signifikante Unterschiede gab, die individuellen Unterschiede waren jedoch zu gering. Die Bindegewebewerte der Femurgruppen waren generell höher als die der Tibiagruppen und die Tendenz ähnlich wie bei der gemeinsamen Untersuchung.

Der Bindegewebeanteil korrelierte negativ mit dem Knochen- und dem Biomaterialanteil ( $p=0.000$ ).

#### **4.5.3 Biomaterial**

Der höchste Anteil noch vorhandenen Biomaterials war bei der gemeinsamen Untersuchung von Femur- und Tibiagruppen eindeutig bei Gruppe II (PGE<sub>2</sub> 1) festzustellen. Es folgten in absteigender Reihenfolge Gruppe V, I, IV und III. Statistisch signifikante Unterschiede waren hier nicht vorhanden.

In der getrennten Betrachtung ergab sich eine gesamthafte Differenz zwischen den Gruppen von  $p=0.027$ . Individuelle Unterschiede zeigten sich mit einem Wert von  $p=0.046$  zwischen der Femurgruppe IV (Hy 10) und der Tibiagruppe II (PGE<sub>2</sub> 1) und mit  $p=0.049$  zwischen der Femurgruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) und ebenfalls der Tibiagruppe II. Alle Tibiagruppen zeichneten sich im Vergleich zu den jeweiligen Femurgruppen durch eine geringere Resorption des Biomaterials aus. Die noch vorhandene Implantatmenge in absteigender Reihenfolge entsprach derjenigen der gemeinsamen Untersuchung.

Der Anteil an noch vorhandenem Biomaterial korrelierte negativ mit dem Knochen und dem Bindegewebeanteil ( $p=0.000$ ).

### **4.6 Histologische Resultate**

Für die semiquantitative Untersuchung wurden Histologieschnitte in einer Toluidinblau-Färbung und der Gegenfärbung nach Mc Neal und in der van Kossa-Färbung beurteilt (Abb. 18-23). Da eine differenzierte Auswertung der Zellen aufgrund der beschriebenen

Qualitätsverluste nicht möglich war, wurde der Anteil vorhandener Proteoglykane in den Gesichtsfeldern A, B und C, sowie das Vorhandensein von Zellen in der Mitte des Implantates (Gesichtsfeld C) beurteilt.

#### 4.6.1 Proteoglykanablagerungen

Die Proteoglykanmenge wurde angesichts der Rosafärbung (pink bei Toluidinblau und violett bei van Kossa/McNeal, Abb. 21 und 23) in den jeweiligen Gesichtsfeldern und anhand des Scoringsystems von Tabelle 3 bewertet (Tab.6). Da Proteoglykane auf enchondrale Ossifikation hinweisen, waren hier neben dem Vorhandensein vor allem die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen von Interesse.

**Tabelle 6: Statistische Ergebnisse der Proteoglykanmenge in den Gesichtsfeldern**

Gruppe	Gesichtsfeld A	Gesichtsfeld B	Gesichtsfeld C
<b>I</b> Femur control plain	1.20±0.5	1.40±0.6	0.60±0.9
Tibia control plain	1.00±0.0	2.00±0.0	0.40±0.6
Total control plain	1.10±0.3	1.70±0.5	0.50±0.7
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	1.00±0.0	2.00±0.0	0.60±0.9
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	1.25±0.5	2.00±0.8	1.00±1.4
Total PGE <sub>2</sub> 1	1.14±0.4	2.00±0.6	0.71±1.0
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	1.75±0.5	1.75±0.5	0.50±0.6
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	1.67±0.5	1.67±0.5	0.50±0.8
Total PGE <sub>2</sub> 50	1.70±0.5	1.70±0.5	0.50±0.7
<b>IV</b> Femur Hy 10	1.80±0.5	1.40±0.6	0.40±0.6
Tibia Hy 10	1.00±0.0	1.50±0.6	0.25±0.5
Total Hy 10	1.44±0.5	1.44±0.5	0.33±0.5
<b>V</b> Femur Hy 100	1.25±0.5	1.50±0.6	0.50±0.6
Tibia Hy 100	1.00±0.0	1.50±0.6	0.25±0.5
Total Hy 100	1.13±0.3	1.50±0.5	0.38±0.5

*Mittelwerte ± Standardabweichung*

*Nach Scoringtabelle 3 : 1 ≡ <20%, 2 ≡ <50%, 3 ≡ >50%*

In allen Gruppen fanden sich in den drei Gesichtsfeldern Proteoglykanablagerungen. In Bezug auf die Menge war zwischen Femur- und Tibiagruppen keine eindeutige Unterscheidung möglich.

Im Gesichtsfeld A am Übergang vom Knochen zum Implantat war mit deutlichem Abstand die höchste Proteoglykanmenge bei Gruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) festzustellen, gefolgt von Gruppe IV mit ebenfalls höheren Werten und, mit ähnlichen niedrigen Mengen, Gruppe II, V und I. Sowohl in der gemeinsamen als auch in der getrennten Betrachtung der Femur- und Tibiagruppen gab es mit p-Werten von 0.013 bzw. 0.007 statistisch

signifikante Unterschiede. Des Weiteren unterschieden sich in der individuellen Betrachtung die Kontrollgruppe und die Gruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) mit einem p- Wert von 0.029 signifikant.

In Gesichtsfeld B am Rand des Bohrlochs waren die Werte in allen Gruppen im Vergleich zu Gesichtsfeld A erhöht oder blieben, wie bei der Gruppe II und IV gleich hoch. Die höchsten Werte konnten hier bei Gruppe II (PGE<sub>2</sub> 1) ausgemacht werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich in der gemeinsamen und auch getrennten Betrachtung mit einem p-Wert von jeweils <0.0001.

In Gesichtsfeld C in der Mitte des Bohrlochs war der prozentuale Anteil von Proteoglykanen in allen Gruppen schon deutlich geringer. Höhere Werte waren hier wieder bei Gruppe II (PGE<sub>2</sub> 1) festzustellen. Es folgten Gruppe III und I, Gruppe V und Gruppe IV. Die statistisch signifikanten Unterschiede entsprachen den Werten in Gesichtsfeld B. In der Mitte des Implantats korrelierten die Menge an gebildeten Proteoglykanen und das Vorhandensein von Zellen positiv miteinander (p=0.004).

#### 4.6.2 Zellen

Das Vorhandensein von Zellen in der Mitte sollte einen Hinweis darauf geben, ob bereits Zellen bis in die Mitte des Implantats eingewandert waren um die Voraussetzung für den Umbau zu neuem Knochen zu schaffen (Tab. 7).

**Tabelle 7: Vorhandensein von Zellen in Gesichtsfeld C**

Gruppe	Zellen ja/nein
<b>I</b> Femur control plain	0.80±0.5
Tibia control plain	0.40±0.6
Total control plain	0.60±0.5
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	0.60±0.6
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	0.50±0.7
Total PGE <sub>2</sub> 1	0.57±0.5
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	0.50±0.6
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	0.67±0.5
Total PGE <sub>2</sub> 50	0.60±0.5
<b>IV</b> Femur Hy 10	1.00±0.0
Tibia Hy 10	1.00±0.0
Total Hy 10	1.00±0.0
<b>V</b> Femur Hy 100	0.75±0.5
Tibia Hy 100	0.50±0.6
Total Hy 100	0.63±0.5

*Mittelwerte ± Standardabweichung*

*Nach Scoringtabelle 4 : 1 ≙ ja, 0 ≙ nein*

Bei Gruppe IV (Hy10), fanden sich in allen untersuchten histologischen Präparaten Zellen in der Mitte des Implantats. In den anderen Gruppen konnte Zellen bei ungefähr 60% der Proben und hierbei eher bei den Femurpräparaten festgestellt werden. Sowohl bei der gemeinsamen als auch bei der getrennten Untersuchung von Femur- und Tibiagruppen gab es bei dem Vergleich der Gruppen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0.000$ ), die sich jedoch im individuellen Vergleich nicht fortsetzten. Das Vorhandensein von Zellen in der Mitte der Implantate zeigte eine positive Korrelation zum Vorhandensein von Proteoglykanen in diesem Bereich ( $p = 0.004$ ).

#### 4.7 Resultate des Mikro CT's

Die Ergebnisse des Mikro CT's ergaben sich aus direkten und indirekten Bemessungen der Proben. Eine Unterscheidung zwischen Knochen und Implantaten war hierbei nicht möglich, da das Mikro CT ausschließlich kalziumhaltige und nicht -haltige Komponenten differenzieren kann und sich die Implantate ebenfalls aus kalziumhaltigen Verbindungen zusammensetzten.

**Tabelle 8: Mittelwerte der Ergebnisse von TV, BV und BS**

Gruppe	TV (mm <sup>3</sup> )	BV (mm <sup>3</sup> )	BS (mm <sup>2</sup> )
<b>I</b> Femur control plain	466.63±0.0	267.64±20.5	2823.58±203.3
Tibia control plain	155.55±0.0	105.53±10.1	730.73±177.1
Total control plain	311.09±164.0	186.59±86.8	1777.16±1117.58
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	467.12±1.1	259.86±50.8	2538.60±304.0
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	144.10±28.0	101.76±21.9	720.12±176.2
Total PGE <sub>2</sub> 1	290.93±169.9	173.62±89.9	1546.70±976.9
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	427.73±77.8	239.21±65.1	2452.90±536.5
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	146.73±21.6	92.82±15.9	811.18±150.4
Total PGE <sub>2</sub> 50	259.13±152.7	151.38±85.3	1467.87±909.5
<b>IV</b> Femur Hy 10	466.63±0.0	286.26±54.2	2373.35±363.0
Tibia Hy 10	155.55±0.0	100.51±10.9	791.07±48.2
Total Hy 10	269.95±162.5	184.94±103.2	1510.29±858.3
<b>V</b> Femur Hy 100	466.62±0.0	324.22±24.8	2362.31±208.9
Tibia Hy 100	155.55±0.0	105.55±12.1	770.41±126.0
Total Hy 100	311.09±166.3	214.88±118.3	1566.36±865.8

TV: total volume, BV: bone volume, BS: bone surface area

Mittelwerte ± Standardabweichung

Das TV (total volume) beschreibt das gemessene Volumen der einzelnen Proben. Aufgrund ihrer anatomischen Platzierung wurde für die Femurproben ein größeres Volumen gewählt als für die Tibiaproben. Daraus ergaben sich auch die gemessenen Unterschiede des (BV), das sich aus den kalziumhaltigen Komponenten innerhalb des gemessenen Volumens zusammensetzt, und der BS (bone surface area), welche die nichtmineralischen Komponenten des Volumens beinhaltet. TV, BV und BS dienen als direkt gemessene primäre Indizes den weiteren Berechnungen.

Signifikante Unterschiede waren zwischen allen Femur- und Tibiaproben der fünf Gruppen festzustellen. Für TV und BV waren hierbei alle p- Werte 0.000, für BS  $\geq 0.060$ .

**Tabelle 9: Mittelwerte der Ergebnisse von BV/TV, BS/TV und BS/BV**

Gruppe	BV/TV (%)	BS/TV ( $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ )	BS/BV ( $\text{mm}^2/\text{mm}^3$ )
<b>I</b> Femur control plain	57.36 $\pm$ 4.4	6.05 $\pm$ 0.4	10.64 $\pm$ 1.5
Tibia control plain	67.84 $\pm$ 6.5	4.70 $\pm$ 1.1	7.08 $\pm$ 2.1
Total control plain	62.60 $\pm$ 7.6	5.37 $\pm$ 1.1	8.86 $\pm$ 2.6
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	55.61 $\pm$ 10.8	5.43 $\pm$ 0.7	10.13 $\pm$ 2.7
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	70.57 $\pm$ 5.7	4.99 $\pm$ 0.6	7.16 $\pm$ 1.4
Total PGE <sub>2</sub> 1	63.77 $\pm$ 11.1	5.19 $\pm$ 0.7	8.51 $\pm$ 2.5
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	55.87 $\pm$ 10.1	5.73 $\pm$ 0.6	10.61 $\pm$ 2.8
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	63.18 $\pm$ 4.4	5.51 $\pm$ 0.4	8.78 $\pm$ 1.1
Total PGE <sub>2</sub> 50	60.30 $\pm$ 7.7	5.60 $\pm$ 0.5	9.51 $\pm$ 2.0
<b>IV</b> Femur Hy 10	61.35 $\pm$ 11.6	5.09 $\pm$ 0.8	8.41 $\pm$ 1.2
Tibia Hy 10	64.62 $\pm$ 7.0	5.10 $\pm$ 0.3	7.96 $\pm$ 1.1
Total Hy 10	63.13 $\pm$ 9.0	5.09 $\pm$ 0.5	8.16 $\pm$ 1.1
<b>V</b> Femur Hy 100	69.48 $\pm$ 5.3	5.06 $\pm$ 0.4	7.36 $\pm$ 1.2
Tibia Hy 100	67.85 $\pm$ 7.8	4.95 $\pm$ 0.8	7.46 $\pm$ 1.9
Total Hy 100	68.67 $\pm$ 6.2	5.01 $\pm$ 0.6	7.41 $\pm$ 1.5

*BV/TV: bone volume density, BS/TV: bone surface density,*

*BS/BV: bone surface/bone volume ratio*

*Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung*

Die BV/TV (bone volume density) gibt die Dichte des Knochenvolumens in % an. Bis auf Gruppe V war die Knochendichte bei den Tibiaproben höher als bei den Femurproben. In der gemeinsamen Betrachtung war die niedrigste Dichte bei Gruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) festzustellen, gefolgt von Gruppe I, IV und II und, mit der höchsten Dichte bei Gruppe V. Bei der getrennten Untersuchung von Femur- und Tibiagruppen war bei

dem Vergleich der Gruppen mit einem p-Wert von 0.017 ein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen, der sich aber im individuellen Vergleich nicht fortsetzte.

Die BS/BV (bone surface density), d. h. die Dichte der nichtmineralisierten Komponenten innerhalb des Volumens, war generell bei den Tibiagruppen größer als bei den Femurgruppen, bei Gruppe IV entsprachen sie sich in etwa. Die höchste Dichte ergab sich dabei mit deutlichem Abstand bei Gruppe III(PGE<sub>2</sub> 50). Der Kontrollgruppe mit ebenfalls höheren Werten folgten die Gruppen II,III,V und V.

Das BS/BV(bone surface/bone volume ratio) kann Aufschluss über das Verhältnis zwischen dem Volumen der nichtmineralisierten und mineralisierten Komponenten geben. Generell waren hierbei bei den Femurgruppen höhere Werte festzustellen als bei den Tibiagruppen. Eine Ausnahme bildete Gruppe V (Hy100) mit etwa gleichen Ergebnissen. Der signifikante Unterschied bei getrennte Betrachtung der Gruppen ( $p=0.006$ ) setzte sich in der individuellen Untersuchung nicht fort.

**Tabelle 10: Mittelwerte der Ergebnisse von DA, Th und SP**

Gruppe	DA	Th (mm <sup>3</sup> )	SP (mm <sup>3</sup> )
<b>I</b> Femur control plain	1.07±0.0	0.23±0.0	0.28±0.0
Tibia control plain	1.06±0.0	0.42±0.2	0.29±0.1
Total control plain	1.07±0.0	0.32±0.2	0.29±0.0
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	1.10±0.0	0.24±0.0	0.41±0.2
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	1.04±0.0	0.32±0.1	0.24±0.0
Total PGE <sub>2</sub> 1	1.07±0.0	0.28±0.1	0.32±0.2
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	1.06±0.0	0.24±0.1	0.32±0.0
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	1.06±0.0	0.25±0.0	0.28±0.1
Total PGE <sub>2</sub> 50	1.06±0.0	0.25±0.0	0.30±0.1
<b>IV</b> Femur Hy 10	1.05±0.0	0.27±0.0	0.44±0.4
Tibia Hy 10	1.05±0.0	0.30±0.0	0.29±0.1
Total Hy 10	1.05±0.0	0.28±0.0	0.36±0.3
<b>V</b> Femur Hy 100	1.04±0.0	0.29±0.0	0.26±0.0
Tibia Hy 100	1.03±0.0	0.34±0.1	0.27±0.0
Total Hy 100	1.04±0.0	0.31±0.1	0.26±0.0

DA: degree of anisotropy, Th: trabecular thickness, SP: trabecular separation

Mittelwerte ± Standardabweichung

DA (degree of anisotropy) als Maß für die Verbindungen zwischen den trabekulären Poren war bei allen Gruppen ungefähr gleich. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der getrennten Betrachtung von Femur- und Tibiagruppen ( $p=0.047$ ) setzte sich

individuellen Vergleich zwischen Femur- und Tibiaimplantaten der Gruppe II mit einem p-Wert von 0.042 fort.

Die Th (trabecular thickness) als Maß für die Dichte der Tabekel im Gesamtvolumen war bei den verschiedenen Gruppen in etwa gleich. Einzig bei der Kontrollgruppe übertrafen die Ergebnisse der Tibiaproben die der Femurproben mit statistischer Signifikanz ( $p=0.036$ ).

Die SP (trabecular separation), die sich nur auf die kalzifizierten Bereiche innerhalb des Volumens bezieht, ergab bei Gruppe IV (Hy 10) die höchsten Werte. Es folgten Gruppe II, III, I und mit den niedrigsten Ergebnissen Gruppe V.

**Tabelle 11: Mittelwerte der Ergebnisse von TbN, Conn.D und BMD**

Gruppe	TbN (1/mm <sup>3</sup> )	Conn.D (1/mm <sup>3</sup> )	BMD (mg HA/cm <sup>3</sup> )
<b>I</b> Femur control plain	3.04±0.1	19.22±4.8	507.90±31.7
Tibia control plain	2.79±0.4	11.36±3.7	595.08±51.3
Total control plain	2.91±0.3	15.29±5.8	551.49±61.1
<b>II</b> Femur PGE <sub>2</sub> 1	2.63±0.6	17.90±5.2	486.05±76.9
Tibia PGE <sub>2</sub> 1	3.24±0.1	11.85±2.6	610.38±46.7
Total PGE <sub>2</sub> 1	2.96±0.5	14.60±4.9	553.86±87.6
<b>III</b> Femur PGE <sub>2</sub> 50	2.87±0.2	18.71±7.3	496.41±78.2
Tibia PGE <sub>2</sub> 50	3.13±0.3	15.27±5.6	549.15±35.6
Total PGE <sub>2</sub> 50	3.02±0.3	16.65±6.2	528.05±59.0
<b>IV</b> Femur Hy 10	2.71±0.9	11.94±2.9	539.91±95.9
Tibia Hy 10	2.98±0.3	12.24±1.7	569.99±47.0
Total Hy 10	2.86±0.6	12.10±2.2	556.30±70.9
<b>V</b> Femur Hy 100	3.14±0.1	11.00±2.5	597.20±33.6
Tibia Hy 100	3.01±0.2	12.01±3.8	596.61±60.4
Total Hy 100	3.07±0.1	11.50±3.0	596.92±45.2

*TbN: trabecular number, ConnD: connectivity density, BMD: bone mineral density*  
Mittelwerte ± Standardabweichung

TbN (trabecular number) gibt die Anzahl der Trabekel im gewählten Volumen an. Sie ergab bei der Kontrollgruppe höhere Femurwerte, zeigte bei Gruppe II und III eine Tendenz zur Umkehrung zu höheren Werten bei den Tibiagruppen und entsprach sich ungefähr bei den Gruppen IV und V.

Die Conn.D (connectivity density), also die Dichte der Konnektionen im Volumen, war bei den Femurgruppen, ausgenommen Gruppe V, höher als bei den Tibiagruppen. Die höchste Konnektivitätsdichte wies Gruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) auf, gefolgt von den Gruppen

I,II,IV und V. Signifikante Unterschiede in der getrennten Betrachtung ( $p=0.01$ ) setzten sich individuell jedoch nicht fort.

Die BMD (bone mineral density) beschreibt die Dichte der Knochenmineralisierung im festgelegten Volumen. Sie war bei den Tibiagruppen höher als bei den Femurgruppen, bzw. entsprach sich bei Gruppe V. Die höchsten Werte erzielte hier Gruppe V (Hy100). Es folgten in absteigender Reihenfolge Gruppe IV,II,I und mit dem niedrigsten Ergebnis Gruppe III. Neben signifikanten Unterschieden in der getrennten Untersuchung ( $p=0.008$ ), war innerhalb der Gruppe II (PGE<sub>2</sub> 1) mit einem p-Wert von 0.049 ein signifikanter Unterschied zwischen Tibia- und Femurproben festzustellen.

**Tabelle 12: Statistische Signifikanzen der Mikro CT-Ergebnisse**

Variable	Getrennte Betrachtung	Femurgruppe	Tibiagruppe	p-Wert
TV	+	alle	alle	0.000
BV	+	alle	alle	0.000
BS	+	alle	alle	$\geq 0.060$
BV/TV	+			0.017
BS/BV	+			0.006
DA	+			0.047
DA		Gruppe II	Gruppe II	0.042
Th	+			0.027
Th		Gruppe I	Gruppe I	-0.036
Conn.D	+			0.010
BMD	+			0.008
BMD		Gruppe II	Gruppe II	0.049

*Statistisch signifikant: p-Werte  $\leq 0.05$*

**Tabelle 13: Korrelationen der Mikro CT- Ergebnisse**

Variable 1 (Mikro CT)	Variable 2 (Histomorphometrie)	Korrelations- koeffizient	p- Wert
BV	Bindegewebe	0.416	0.003
BV	Implantat	-0.377	0.008
BS	Bindegewebe	0.568	0.000
BS	Implantat	-0.433	0.002
BV/TV	Bindegewebe	-0.403	0.004
BV/TV	Implantat	0.311	0.03
BS/TV	Bindegewebe	0.335	0.019
BS/BV	Bindegewebe	0.470	0.001
Conn.D	Bindegewebe	0.376	0.008
BMD	Bindegewebe	-0.390	0.006
BMD	Implantat	0.364	0.010

*Statistisch signifikant: p-Werte  $\leq 0.05$*



#### 4.8 Konzentrationen der biomimetischen Substanzen

Bei der mit der Hochleistungsflüssigkeitstomographie durchgeführten Konzentrationsbestimmung der chronOS-Blöcke in der Firma Synthes (Oberdorf, Schweiz) war festzustellen, dass die Konzentrationen in den jeweiligen Tauchlösungen nicht mit Konzentrationen übereinstimmten, die sich tatsächlich in den Blöcken befanden und sowohl für PGE<sub>2</sub> als auch für HY erheblich niedriger waren (Tab.14 und 15).

**Tabelle 14: Konzentration von PGE<sub>2</sub> in den chronOS-Blöcken**

Konzentration der Tauchlösung	Blöcke	PGE <sub>2</sub>
100µM	1	6,4µg/Block
	2	6,2µg/Block
10µM	1	0,49µg/Block
	2	0,53µg/Block

**Tabelle 15: Konzentration von Hydroxyfasudil in den chronOS-Blöcken**

Konzentration der Tauchlösung	Blöcke	Hydroxyfasudil
50µM	1	4,6µg/Block
	2	4,6µg/Block
1µM	1	0,1µg/Block
	2	0,1µg/Block

In der Zusammenfassung aller Resultate kann festgehalten werden, dass im Allgemeinen in der Zeitspanne von 2 Monaten bei der Gruppe III (PGE<sub>2</sub> 50) am meisten neuer Knochen gebildet und gleichzeitig am meisten Biomaterial resorbiert wurde. Im Vergleich dazu zeigte die Gruppe IV (Hy10) eine ähnlich intensive Knochenneubildung, hingegen war die Resorption des Biomaterials geringer. Die histologischen Ergebnisse waren nur bedingt vergleichbar mit denjenigen des µCT, da letzteres bei seinen Messungen keine Unterschiede zwischen dem verbleibenden Biomaterial und neu gebildetem Knochen errechnet sondern lediglich kalzifizierte Substanz messen kann.

## 5 Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die fünf untersuchten Gruppen insgesamt eine gute Biokompatibilität, eine gute Resorptionsfähigkeit und eine gute Knochenneubildung aufwiesen. Alle Implantate wurden durch das Prinzip eines schleichenden Knochenersatzes ersetzt<sup>92</sup>, wobei sich die einzelnen Gruppen in der Geschwindigkeit der Knochenneubildung deutlich unterschieden. Die beste knochenbildende Wirkung erzielte hierbei konzentrationsabhängig PGE<sub>2</sub>, aber auch Hy zeigte bessere Resultate als die nichtimprägnierten Blöcke.

### 5.1 Versuchsmodell

Es gibt zahlreiche Studien, die sich mit der Frage beschäftigen, welche Tierart für die Forschung am Knochen geeignet sein kann<sup>93,94</sup>. Das Schaf als phylogenetisch hoch stehende Spezies verfügt grundsätzlich über die Voraussetzungen, die es als Versuchsmodell für die humanmedizinische Forschung benötigt. Es weist in Bezug auf Gewicht, Knochenaufbau, -stoffwechsel und -heilung Ähnlichkeiten zum Menschen auf<sup>93</sup> und lässt sich im Vergleich zu anderen Tieren auch während der Versuchsphase problemlos artgerecht und ökonomisch halten.

In den letzten Jahren wurden mehreren Studien, die auf dem „Drill hole model“ basierten, erfolgreich beim Schaf durchgeführt<sup>37,89,95-98</sup>. Die Komplikationsrate durch z. B. spontane Frakturen aufgrund falscher Implantatplatzierung konnte durch eine korrekte chirurgische Ausführung sehr gering gehalten werden<sup>89</sup>. In der vorliegenden Studie wurde eine leicht abgewandelte Form des Modells gewählt, indem je ein Defekt im distalen Bereich des Femurs und proximalen Bereich der Tibia beider Hintergliedmaßen gesetzt wurde. Dies hatte zur Folge, dass die Tiere intraoperativ nicht mehr gewendet werden mussten und an jeder Hintergliedmaße nur ein Schnitt für zwei Implantate nötig war, was die Operationszeit drastisch verkürzte und damit die Belastung für die Tiere etwas verringerte. Gleichzeitig konnte die Tierzahl relativ gering gehalten werden, da die verwendeten 15 Tiere jeweils an 4 Lokalisationen operiert wurden. Dies ermöglichte auch einen Vergleich des Materials in unterschiedlichen Knochenstrukturen innerhalb des gleichen Schafes. Da Alter und Geschlecht der Tiere die Knochenheilung beeinflussen<sup>93,94</sup>, d.h. beispielsweise bei juvenilen Tieren die Knochenheilung im Vergleich zu adulten deutlich beschleunigt ist, wurden in dieser Studie ausschließlich adulte, weibliche Tiere ausgewählt.

Die Wahl des Beobachtungszeitraumes von acht Wochen beruhte auf der Erfahrung, dass durch die schnelle Resorption der Implantate mit anschließender Knochenneubildung eine aussagekräftige Unterscheidung zwischen den einzelnen Gruppen zu einem späteren Zeitpunkt vermutlich nicht mehr möglich gewesen wäre<sup>37</sup>.

## **5.2 Implantatherstellung und Vorbereitung**

Die Herstellung der Implantate erfolgte unter standardisierten Bedingungen. Die Imprägnierung der chronOS- Rohlinge wurde allerdings nicht, wie in anderen Studien beschrieben<sup>16</sup>, im Vakuum durchgeführt, was auf einen unvollständigen Luftentzug schließen lässt. Kleine Luftbläschen im Implantat führen zu einer Störung der Mikrozirkulation und können dadurch eine Hemmung der Knochenbildung bewirken. In einem extern durchgeführten Versuch wurde weiterhin festgestellt, dass die Konzentrationen an PGE<sub>2</sub> und Hy in den jeweiligen Tauchlösungen deutlich höher waren als die sich tatsächlich in den Blöcken befindlichen Konzentrationen. Das Imprägnierungsverfahren sollte daher weiter optimiert werden. Es lässt aber vermuten, dass die positiven Wirkungen, die vor allem in Gruppe III und IV festzustellen waren und bereits bei niedrigeren Konzentrationen auftraten, bei richtiger Konzentration sogar verstärkt würden.

## **5.3 Operation**

Die standardisiert durchgeführten Operationen verliefen im Großen und Ganzen komplikationslos. Die Perfusion der Implantate erfolgte mit arteriellem Blut, welches problemlos und schnell während der Operation gewonnen werden konnte und, wie bereits in 1.4.3. beschrieben, zur Verbesserung der osteogenetischen Eigenschaften der Implantate eingesetzt wurde. Die Perfusion wurde mit größt möglicher Vorsicht durchgeführt, um ein Heraussaugen bzw. Wegspülen der bereits in den Blöcken enthaltenen biomimetischen Substanzen zu vermeiden. Es wurde schrittweise nur so viel Blut zugegeben, wie von den Implantaten aufgenommen werden konnte. Da aber das genaue Fassungsvermögen der Blöcke nicht bekannt war, könnte die Perfusion zu einem weiteren Konzentrationsverlust in den Implantaten geführt haben. Die Implantation selbst erfolgte problemlos. Neben den bereits erwähnten Vorteilen des modifizierten „Drill hole model“ zeigten sich die sich unter dynamischen Bedingungen der Gelenkflexion erschwerten anatomischen Verhältnisse als nachteilig. Durch das Strecken der Hintergliedmaßen wurde der Gelenkspalt so stark zusammengepresst, dass

aus Versehen bei drei Tieren das Femurimplantat in die proximale Tibia anstatt in den Femurkondylus gesetzt wurde, bei zwei von ihnen mit Gelenkbeteiligung. Die betroffenen Proben wurden daraufhin von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Der etwas variable Sitz weiterer Tibiaimplantate sowie die kurzfristige Eröffnung des Tibiofemoralgelenks von Schaf 3712 wirkten sich hingegen nicht gravierend nachteilig auf die Ergebnisse aus.

Die beschriebenen chirurgischen Probleme bei der Auffindung der exakten Bohrlochlokalisation sind mit dem Einsatz einer Bohrlochschaablone aufgrund fehlender anatomischer Orientierungspunkte nicht möglich. Der einzige zuverlässige Anhaltspunkt für das Setzen der Bohrdefekte ist die korrekte Darstellung des medialen kollateralen Seitenbandes des Kniegelenkes. Ausschlaggebend ist damit für eine genaue Positionierung der Bohrlochdefekte vor allem die chirurgische Erfahrung. Dies unterstreicht die bereits bekannte Tatsache, dass jedes neue Tiermodell einer gewissen Lernkurve der Chirurgen unterworfen ist, bis zuverlässig standardisierte Ergebnisse erhalten werden.

### **5.4 Postoperative Phase**

Die postoperativ auftretenden Serome wurden mit großer Wahrscheinlichkeit durch eine Wundreaktion ausgelöst, die durch den chirurgischen Eingriff und die damit verbundenen Weichteilpräparation hervorgerufen wurde. Wie bereits in vorangehenden Drill hole-Studien beschrieben<sup>95,98</sup>, bildeten sich diese aber bei fast allen Tieren nach einiger Zeit selbstständig wieder zurück. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Serome unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit entwickelten und keines der Implantate nach dem Einsetzen über den Knochenkortex herausragte, ist eine substanzbedingte chemische Reizung oder eine implantatbedingte mechanische Reizung eher unwahrscheinlich.

Die bei Schaf 3711 auftretende eitrige Infektion im Nahtbereich des rechten Hinterbeins kann entweder durch eine intra- oder postoperative Kontamination hervorgerufen worden sein oder eine Reaktion auf den für die Intrakutannaht verwendeten resorbierbaren Faden (Vicryl® 2/0; Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgien) sein. Gegen eine intraoperative Kontamination spricht die Tatsache, dass die entzündlichen Veränderungen erst 19 Tage post operationem auftraten. Zur Vermeidung einer postoperativen Kontamination wurde bei der Operation eine sterile Gaze über dem Wundbereich angebracht und erst nach 4 Tagen entfernt. Eine spätere sekundäre

Kontamination kann natürlich nicht ausgeschlossen werden. Hierfür spricht, dass die Wunde nach einer desinfizierenden und antibiotischen Behandlung innerhalb von drei Tage sehr gut abheilte. Bei einem weiteren Tier, Schaf 3714, traten ebenfalls nach zwei Wochen eitrige Entzündungen im Wundbereich beider Hintergliedmaßen auf. Der Faden der Intrakutannaht wurde nach und nach abgestoßen, es bildeten sich hochgradige Serome und die Wundnaht brach auf, obwohl das Tier über einen Zeitraum von zwei Wochen durchgehend unter intensiver desinfizierender und antibiotischer Behandlung stand. Die klinischen Symptome waren eindeutig als starke Abstoßungsreaktion des Fadens mit einer anschließenden hochgradigen Infektion des Wundbereichs zu bewerten und führten zu einem stark verschlechterten Allgemeinzustand des Schafes. Es wurde daraufhin aus Tierschutzgründen frühzeitig aus dem Versuch genommen und die Proben nicht verwendet. Die Schafe 3707 und 3708 zeigten mittelgradige Lahmheiten, die sich bis zum Schlachtermin noch verstärkten und mit der bereits beschriebenen falschen Platzierung der Implantate zu erklären sind.

## **5.5 Makroskopische Resultate**

Bei der makroskopischen Beurteilung der Knochen fielen bei mehr als einem Drittel der Implantatstellen mittel- bis hochgradige Verwachsungen des umliegenden Bindegewebes auf. Dabei gab es keine direkte Zuordnung zu einer bestimmten Gruppe. Auffallend war jedoch, dass bei allen Gruppen vor allem die Tibiaproben betroffen waren. Eine Erklärung hierfür könnte die geringgradige Varianz der Bohrlochlokalisationen und die damit verbundene unterschiedliche periostale Reaktion auf den chirurgischen Eingriff geben. An mechanisch stärker belasteten Stellen wie dem Tibiaplateau ist auch die vom Periost ausgehende Bindegewebebildung stärker und führt somit zu stärkeren Verwachsungen. Ein Einfluss auf die Ergebnisse war jedoch in dieser Studie nicht festzustellen. Die makroskopische Untersuchung zeigte weiterhin den falschen Sitz der Proben 3706 FR, 3707 FL und 3708 FR mit einer Gelenkbeteiligung der letzten beiden. Die dabei auftretenden Entzündungsreaktionen von Weichteil-, Knochen- und Knorpelgewebe lassen sich eindeutig auf die Fehlplatzierung zurückführen, da keine andere Proben dieser Gruppe vergleichbare Reaktionen aufwiesen.

## 5.6 Probenaufbereitung und –auswertung

Die Probenaufbereitung erfolgte nach einem für unser Labor standardisierten Verfahren. Beim Schneiden der Histomorphometrie- und Histologieschnitte wurde bei den Femurpräparaten in der Längsachse die Mitte des Implantates mit 6mm gewählt. Der Knochen konnte in dieser Ebene nur von außen nach innen in das Implantat einwachsen. Dabei wurden mögliche Verfälschungen der Ergebnisse durch ein gesteigertes Knochenwachstum oder gesteigerte zelluläre Reaktionen am „Deckel“ oder „Boden“ des Implantatzylinders vermieden. Die Tibiaschnitte wurden hingegen bereits bei einer Tiefe von 3mm geschnitten. Das ermöglichte einen immer noch genügenden Abstand zum „Deckel“ und stellte gleichzeitig sicher, dass auch Schnitte von etwas zu weit distal platzierten Implantaten beurteilt werden konnten, die bei einer Tiefe von 6mm bereits von Knochenmark umgeben gewesen wären. Damit wurde dem bereits in einer vorangehenden Studie<sup>42</sup> aufgetretenen Problem Rechnung getragen, bei der im Knochenmark gelandete  $\beta$ -TCP Zylinder kein Knochenwachstum gezeigt und damit zu großen statistischen Unterschieden geführt hatten. Allerdings wurde durch Wahl der 3mm- Schnittebene bei den Tibiaschnitten hauptsächlich kortikaler Knochen oder ein Übergang zwischen kortikalem und spongiösem Knochen angeschnitten (Abb.15-17). Bei den Femurschnitten handelte es sich hingegen ausschließlich um spongiösen Knochen (Abb.12-14). Aus diesem Grund wurden bei der weiteren Auswertung Femur- und Tibiagruppen sowohl gemeinsam als auch getrennt beurteilt, um auf die Unterschiede eingehen zu können, die auf einer unterschiedlichen Knochenstruktur beruhten.

Die Dickschnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt. Diese Oberflächenfärbung eignet sich gut zur Beurteilung der einzelnen Komponenten innerhalb der Bohrlöcher. Bei der anschließenden Bildanalyse mit Hilfe des Adobe Photoshop- Programms zeigte sich jedoch, dass an wenigen Stellen eine Unterscheidung zwischen Knochen und Implantat nicht möglich war, da sie gleich angefärbt worden waren. Aufgrund der Tatsache, dass es sich nur um wenige Pixel pro Bild handelte und der Einfluss auf die Ergebnisse somit minimal war, wurde hierauf nicht weiter eingegangen.

Die Bewertung der Dünnschnitte erfolgte mit der van Kossa-Färbung und der Toluidinblau/Mc Neal- Färbung, wobei sich die erste sehr gut zur Beurteilung des neu gebildeten Knochens eignet und die zweite eine detaillierte Beurteilung zellulärer Ab- und Aufbaumechanismen erlaubt. Eine durchgehend gleichmäßige Zelltypifizierung

war jedoch aufgrund der in 3.5 beschriebenen Qualitätsverluste nicht möglich. Die poröse Konsistenz des Biomaterials und die vom Blut stammenden, noch nicht abgebauten Fibrinclots im Inneren der Implantate führten dazu, dass die histologischen Strukturen bei der Herstellung der Dünnschnitte beschädigt und teilweise sogar zerstört wurden. Dieses Problem war in vorangegangenen Studien, die ebenfalls  $\beta$ -TCP Keramiken verwendet hatten<sup>26,31,37</sup>, nicht aufgetreten. In diesem Fall könnten die vorhandenen Fibrinclots Grund für eine zu geringe Infiltration der Implantate mit MMA gewesen sein, was zur bröckeligen Konsistenz des Biomaterials und den damit verbundenen Qualitätseinbußen führte. In den repräsentativ gewählten Gesichtsfeldern (Abb.1) wurden daher anhand eines Scoringsystems (Tab. 3) die gut zu beurteilenden Proteoglykanablagerungen untersucht, die einen Hinweis auf die enchondrale Ossifikation als direkte Vorstufe der sekundären Knochenneubildung geben (Abb. 21 und 23). Des Weiteren wurde qualitativ das Vorhandensein von Zellen in der Mitte des Implantats untersucht. Hiermit sollte geprüft werden, ob das Implantat die Voraussetzungen besitzt, das Einwachsen von Zellen bis ins Implantatinnere in den festgelegten 8 Wochen zu ermöglichen. Die Bewertung der Biokompatibilität beruhte aufgrund der fehlenden differenzierenden Zellbeurteilung auf den makroskopischen, radiologischen und histomorphometrischen Ergebnissen, die jedoch durchaus zeigen konnten, dass alle fünf Gruppen in hohem Maße biokompatibel waren. Die deskriptive Statistik wurde mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 13.0 und des Post-hoc-Test nach Bonferroni erstellt. Sie ergab sowohl bei der histologischen als auch bei der histomorphometrischen Auswertung signifikante Unterschiede, trotz der aus Tierschutzgründen gewählten geringen Tierzahl. Es ist anzunehmen, dass bei einer größeren Gruppenzahl noch vermehrt signifikante Unterschiede zwischen den individuellen Gruppen aufgetreten wären. Nichts desto trotz zeigen die vorliegenden Ergebnisse deutliche Tendenzen, die für weiterführende Studien eine gute Grundlage bilden.

## **5.7 Histomorphometrische Resultate**

Bei der histomorphometrischen Auswertung wurde aufgrund der unterschiedlichen Lage der Implantate und der damit verbundenen verschiedenen Knochendichte eine Trennung zwischen Tibiaimplantaten und Femurimplantaten vorgenommen. Geflechtknochen besitzt mit seiner lockeren Trabekelstruktur reichlich Knochenmark und eine Fülle angiogenetischer und osteogenetischer Zellen die Grundvoraussetzung

für eine gute Knochenheilung bzw. –neubildung<sup>15</sup>. Kortikaler Knochen zeigt mit einer sehr viel dichteren Struktur vergleichsweise weniger optimale Bedingungen für die Bildung neuen Knochens. Becker et al. beschrieben jedoch anhand eines fehlplazierten Implantats, dass auch im Kontaktbereich von kortikalem Knochen ein lokales Einwachsen möglich ist<sup>16</sup>. Auch der biologische Knochenabbau wird laut Le Geros et al. vom kortikalen oder spongiösen Knochentyp beeinflusst<sup>21</sup>. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigten die vorangegangenen Aussagen. Bis auf Gruppe III war bei allen Gruppen der Anteil neugebildeten Knochens bei den „spongiösen Femurgruppen“ (Abb. 12-14) höher als bei den eher „kortikalen Tibiagruppen“ (Abb. 15-17), die jedoch auch gute Ergebnisse zeigten. Ebenso verhielt es sich mit dem Bindegewebsanteil und der Resorption des Implantates, bei denen die Femurgruppen, wie zu erwarten, ebenfalls bessere Resultate erzielten. Bei dem neugebildeten Knochen handelte es sich in allen fünf Gruppen um Geflechtknochen. Die beste Remodellierungsrate zeigte mit deutlichem Abstand die Gruppe III mit einer Knochenbildung von 40,94% und statistisch signifikanten Unterschieden zu niedriger konzentrierten Gruppe II und der Kontrollgruppe. Dabei wurden erstaunlicherweise besonders hohe Werte in der Tibiagruppe erzielt. Es folgte ebenfalls mit guten Ergebnissen die Gruppe IV, bei der die Femurgruppe mit 39,17% sogar eine höhere Knochenneubildung aufwies, als die der Gruppe III. Die niedriger konzentrierten Gruppen V und II zeigten dagegen mit  $\pm 30\%$  ähnlich niedrige Ergebnisse, wie die Kontrollgruppe. Die Knochenmenge korrelierte negativ mit der Menge an Bindegewebe und Implantat, was sich mit dem schleichenden Ersatz von Biomaterial und Bindegewebe durch Knochen erklären lässt<sup>99</sup>.

Der so genannte Bindegewebeanteil, der sich nicht nur aus Bindegewebe im engeren Sinne, sondern auch aus Blutgefäßen, Knochenmark und Zellen, wie z. B. Progenitorzellen, zusammensetzte, bewegte sich bei allen Gruppen mit durchschnittlichen Werten zwischen 28% und 34% verglichen mit trabekulärem Knochen im Normalbereich. Die vorgefundene normale Verteilung des Bindegewebes zwischen den Knochentrabekeln und Implantatresten wies auf ein physiologisches Heilungsgeschehen hin, nicht jedoch auf eine Abwehrreaktion. Des Weiteren konnten bei keiner Gruppe Anzeichen einer bindegewebigen Kapsel um das Implantat festgestellt werden, die Zeichen einer Unverträglichkeitsreaktion oder einer mangelnden Biokompatibilität<sup>100</sup> gewesen wären. Auch eine zu schnelle Resorption mit entzündlicher und anschließend bindegewebiger Reaktion<sup>2</sup> war nicht festzustellen. Auffällig war jedoch dass sich Gruppe III und IV durch einen deutlich niedrigeren



Bindegewebeanteil bei einer hohen Knochenbildung auszeichneten. Bei der Kontrollgruppe war im Gegensatz dazu der Bindegewebeanteil sehr viel höher als der Anteil neu gebildeten Knochens und bei Gruppe II und V entsprachen sie sich in etwa. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass die erstgenannten Gruppen eine vergleichsweise bessere und beschleunigte Remodellierungsrate aufweisen. Bestätigt wurde diese Aussage auch durch die noch vorhandene Menge an Biomaterial in den jeweiligen Gruppen. Wie zu erwarten war hierbei der Anteil von Gruppe II, V und I mit Werten zwischen 37% und 44% am höchsten. Eine bessere Implantatresorption zeigten erneut Gruppe IV mit 34% und Gruppe III mit 31% noch vorhandenem Biomaterial. Die deutlichsten, statistisch signifikanten Unterschiede waren dabei zwischen den Femurgruppen der beiden letztgenannten und den Tibiagruppen von Gruppe II auszumachen. Diese signifikanten Ergebnisse können einerseits auf die insgesamt bessere Resorption der Gruppen III und IV zurückgeführt werden, hängen aber sicherlich auch mit den verschiedenen Lokalisationsorten der Implantate zusammen.

## **5.8 Histologische Resultate**

Bei der indirekten Knochenbildung wird im Rahmen der enchondralen Ossifikation von den Osteoblasten Osteoid gebildet. Hierbei handelt es sich um eine proteoglykanhaltige Interzellulärsubstanz, die sich in den in diesem Versuch verwendeten histologischen Färbungen pink bzw. violett darstellt (Abb.21 und 23). Da bis zu 70% der Proteoglykanablagerungen nach 3-4 Tagen kalzifizieren<sup>101</sup>, kann durch ihre Bestimmung nicht nur das Vorhandensein sondern auch der ungefähre Zeitpunkt der enchondralen Ossifikation eingeschätzt werden. Dies ermöglicht einen Eindruck darüber, wie sich die Knochenneubildung kurze Zeit nach der Schlachtung entwickelt hätte. In Gesichtsfeld A waren mit statistischer Signifikanz die meisten Proteoglykanablagerungen bei Gruppe III und nachfolgend Gruppe IV festzustellen, die damit die größte Tendenz zur Knochenneubildung zeigten. Die drei anderen Gruppen wiesen ähnlich niedrige Werte auf, wobei die schlechtesten Ergebnisse bei der Kontrollgruppe auszumachen waren, die sich signifikant von denen der Gruppe III unterschieden. In den Gesichtsfeldern B und C zeigte sich hingegen, ebenfalls mit statistischen Unterschieden, eine andere Reihenfolge. Die höchsten Werte erzielte hier die Gruppe II, gefolgt von Gruppe III und I, Gruppe V und Gruppe IV. Diese Resultate lassen vermuten, dass auch die niedriger konzentrierte PGE<sub>2</sub> 1- Gruppe und die Kontrollgruppe zu einem um einige Tage späteren Zeitpunkt eine deutliche Steigerung

ihrer Remodellierungseigenschaften gezeigt hätten. Das schlechte Abschneiden der Gruppe IV relativiert hingegen dessen gute Ergebnisse in Gesichtsfeld A. Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Auswertung subjektiv durchgeführt wurde und im Vergleich zu den objektiven histomorphometrischen Ergebnissen eher Tendenzen aufzeigen sollte.

Bei der Beurteilung der Zellen in der Mitte des Implantates fanden sich ausschließlich bei Gruppe IV in allen histologischen Schnitten Zellen. Bei den anderen Gruppen konnten dagegen nur in ungefähr 60% der Proben Zellen ausgemacht werden und das eher in den Femurpräparaten. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen lassen darauf schließen, dass das niedriger konzentrierte Hy die Voraussetzung für das Einwandern von Zellen ins Implantatinnere in dem gegebenen Zeitraum deutlich positiver beeinflusste als die übrigen Gruppen, bei denen durchschnittlich ca. 40% noch keine Zellen in Gesichtsfeld C enthielten. Dass die Femurpräparate insgesamt besser Ergebnisse erzielten, ist mit Sicherheit auf die bereits erwähnten anatomischen Gegebenheiten des Implantationsortes mit mehr Knochenmark, angiogenetischen und osteogenetischen Zellen zurückzuführen.

Die positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Zellen und dem Anteil an Proteoglykanen in der Mitte des Implantates lässt sich logischerweise damit erklären, dass nur vorhandene Zellen die proteoglykanhaltige Interzellulärsubstanz bilden können. Dass jedoch Hy10 einerseits den niedrigsten Proteoglykananteil und andererseits in allen Präparaten Zellen aufwies, zeigt, dass durch die qualitätsbedingten Mängel keine so eindeutigen Ergebnisse geliefert werden konnten, wie es vielleicht bei einer typifizierten Zellbeurteilung möglich gewesen wären.

### **5.9 Resultate des Mikro CT's**

Grundsätzlich bestätigten die Resultate des Mikro CT's diejenigen der histologischen, vor allem aber der histomorphometrischen Auswertung, obwohl in einem oberflächlichen und ersten Direktvergleich eine Divergenz zwischen den Werten auszumachen war. Wurden jedoch die Prozentflächen von Knochen und Biomaterial in der 2-D Auswertung der Histomorphometrie zusammen genommen und dann mit denjenigen der 3-D Kalkulation der  $\mu$ CT Auswertung verglichen, dann stimmten die Ergebnisse und Befunde mehrheitlich überein. In beiden Fällen gibt es Fehlerquellen, die mit der Natur der Messungen zusammenhängen. Während eine 2-D Darstellung in histologischen Präparaten mehr oder weniger einer Momentaufnahme innerhalb eines Zylinders entspricht, ergeben sich ähnliche Fehler bei der mathematischen Errechnung

eines nicht homogen strukturierten Zylinderkörpers beim  $\mu$ CT. Dazu kommt die Tatsache, dass beim  $\mu$ CT lediglich kalzifizierte Strukturen gemessen werden können und im Falle von Implantaten aus Kalziumphosphaten nicht schlüssig zwischen Knochengewebe und Implantat unterschieden werden kann. Unsere Resultate zeigen deutlich, dass bei der Verwendung von kalziumhaltigen Implantaten die Knochenbildung nicht ausschließlich auf  $\mu$ CT Kalkulationen, sondern in jedem Fall nur in Ergänzung zu der histologischen, und dort vor allem histomorphometrischen, Auswertung bewertet werden darf.

### **5.10 Schlussfolgerung und Perspektiven**

In der vorliegenden Studie sollten  $\text{PGE}_2$  und Hydroxyfasudil als Imprägnierung von  $\beta$ -TCP Keramiken auf ihre biomimetischen Eigenschaften geprüft und mit einer nicht imprägnierten Kontrollgruppe verglichen werden. Alle untersuchten Gruppen zeigten eine gute Biokompatibilität, Osteokonduktion und -integration mit einem guten Knochen-Implantatkontakt. Bei den osteoinduktiven Eigenschaften übertrafen sowohl die mit  $\text{PGE}_2$  als auch die mit Hy imprägnierten Keramiken die Kontrollgruppe. Sie taten dies jedoch in einer deutlichen Dosisabhängigkeit. So erzielte  $\text{PGE}_2$  in der Konzentration von  $50\mu\text{M}$  ( $\text{PGE}_2$  50) mit dem höchsten Anteil an neu gebildetem Geflechtknochen und einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen Knochenaufbau und Resorption die besten anabolen Ergebnisse, ohne dabei die von ihm bekannten Nebenwirkungen zu zeigen. In der niedrigeren Konzentration ähnelten die Resultate hingegen eher denen der Kontrollgruppe. Auch Hydroxyfasudil zeigte konzentrationsabhängig unterschiedliche osteoinduktive Eigenschaften. Das niedriger konzentrierte Hy 10 erzielte nach  $\text{PGE}_2$  50 die besten Ergebnisse und konnte diese teilweise sogar noch übertreffen, während das höher konzentrierte Hy 100 sich ebenfalls eher den Werten der Kontrollgruppe annäherte. Sowohl  $\text{PGE}_2$  als auch Hy können demnach zu den von Fini et al. beschriebenen positiv wirkende Stimuli zählen, die die Zellaktivität und Proliferation stimulieren<sup>12</sup> und damit als osteoinduktive Mediatoren die Eigenschaften ihrer Trägerstoffe verbessern. Um dabei keine Imbalance zwischen Knochenabbau und -neubildung hervorzurufen<sup>44</sup> ist vor allem die Kenntnis über die effektivste Dosis von großer Bedeutung<sup>17</sup>. Da die Dosierungen in dieser Studie jedoch nicht den angestrebten Konzentrationen entsprachen, sollten in einem nächsten Schritt weitere Versuche mit definierten Konzentrationsreihen durchgeführt werden, um die

erhaltenen Ergebnisse weiter einzugrenzen und zu optimieren. Als Komposite mit  $\beta$ -TCP Keramiken beschränkt sich der Einsatz von PGE<sub>2</sub> und Hy auf nicht lasttragende Indikationen. Hier könnten sie vor allem in der Bekämpfung der Osteoporose, im Falle von Hydroxyfasudil sogar der glukokortikoid-induzierten Osteoporose an Bedeutung gewinnen<sup>51,67</sup>. Bisher ist es noch nicht gelungen, ein Knochenersatzmaterial zu finden, das in seinen Eigenschaften dem autogenen Knochentransplantat entspricht. Die Herausforderung besteht daher vor allem in der Entwicklung von Materialkombinationen, deren positive Eigenschaften sich ergänzen und potenzieren, um dem Goldstandard so nahe wie möglich zu kommen. Und so gilt auch heute noch der von Habal und Reddi geprägte Satz zur Entwicklung von Knochenersatzstoffen: „...the basic principles have been established and one can optimistically predict progress in the future“<sup>102</sup>.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Gotzen L, Garrel T, Hofmann C: Knochenersatz Aktueller Stand und Perspektiven. In: Oesten HJ, Probst J, editors. 61. Jahrestag der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York, 1997
2. Rueger JM: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. Orthopäde 27:72-79, 1998
3. Govindaraj S, Costantino PD, Friedman CD: Current use of bone substitutes in maxillofacial surgery. Facial Plast Surg 15:73-81, 1999
4. Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, et al: [Bone substitutes]. Orthopäde 32:2-10, 2003
5. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E: Bone substitutes: an update. Injury 36 Suppl 3:S20-27, 2005
6. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop Relat Res:10-27, 2000
7. Moore WR, Graves SE, Bain GI: Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg 71:354-361, 2001
8. Linhart W, Briem D: Knochenersatz 2000 bis 2010. Orthopäde, 2001
9. von Rechenberg B: Frakturheilung, Olof Dietz, Lutz-Ferdinand Litzke: Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner 6, S.244, 2004
10. Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res:S7-21, 1998
11. Einhorn TA: The science of fracture healing. J Orthop Trauma 19:S4-6, 2005
12. Fini M, Motta A, Torricelli P, et al: The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. Biomaterials 26:3527-3536, 2005
13. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res:299-308, 1986
14. Hollinger JO, Kleinschmidt JC: The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. J Craniofac Surg 1:60-68, 1990
15. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, et al: Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. Clin Oral Implants Res 9:137-150, 1998
16. Becker S, Maissen O, Ponomarev I, et al: Osteopromotion with a plasmatransglutaminase on a beta-TCP ceramic. J Mater Sci Mater Med 19:659-665, 2008
17. Giannoudis P, Psarakis S, Kontakis G: Can we accelerate fracture healing? A critical analysis of the literature. Injury 38 Suppl 1:S81-89, 2007
18. Albee FH: Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. Ann Surg 71:32-39, 1920
19. LeGeros RZ: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res:81-98, 2002
20. Eggli PS, Muller W, Schenk RK: Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop Relat Res:127-138, 1988
21. LeGeros RZ: Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. Clin Mater 14:65-88, 1993
22. Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Relat Res:259-278, 1981

23. Koerten HK, van der Meulen J: Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 44:78-86, 1999
24. Böhner M, Baumgart F: Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 25:3569-3582, 2004
25. Tadić D, Epple M: A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 25:987-994, 2004
26. Theiss F, Apelt D, Brand B, et al: Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 26:4383-4394, 2005
27. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, et al: Role of bone substitutes. *Clin Orthop Relat Res*:55-65, 1996
28. Niedhart C, Maus U, Redmann E, et al: In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *J Biomed Mater Res* 55:530-537, 2001
29. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2:187-208, 1991
30. Geesink RG, de Groot K, Klein CP: Bonding of bone to apatite-coated implants. *J Bone Joint Surg Br* 70:17-22, 1988
31. Kuemmerle JM, Oberle A, Oechslin C, et al: Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 33:37-44, 2005
32. van Hemert WL, Willems K, Anderson PG, et al: Tricalcium phosphate granules or rigid wedge preforms in open wedge high tibial osteotomy: a radiological study with a new evaluation system. *Knee* 11:451-456, 2004
33. Muschik M, Ludwig R, Halbhüner S, et al: Beta-tricalcium phosphate as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: preliminary results of a prospective clinical study. *Eur Spine J* 10 Suppl 2:S178-184, 2001
34. Walsh WR, Vizesi F, Michael D, et al: Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 29:266-271, 2008
35. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, et al: Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3:1-8, 1995
36. Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al: Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 10:111-120, 1999
37. von Doernberg MC, von Rechenberg B, Böhner M, et al: In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 27:5186-5198, 2006
38. Yokozeki H, Hayashi T, Nakagawa T, et al: Influence of surface microstructure on the reaction of the active ceramics in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 9:381-384, 1998
39. Toth JM, An HS, Lim TH, et al: Evaluation of porous biphasic calcium phosphate ceramics for anterior cervical interbody fusion in a caprine model. *Spine* 20:2203-2210, 1995
40. Chang BS, Lee CK, Hong KS, et al: Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials* 21:1291-1298, 2000

41. Schenk RK: Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. *Hefte zur Unfallheilkunde* 216:223-235, 1991
42. Becker S, Maissen O, Ponomarev I, et al: Osteopromotion by a beta-tricalcium phosphate/bone marrow hybrid implant for use in spine surgery. *Spine* 31:11-17, 2006
43. Wiesner E: *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Auflage, Enke Verlag. 2000
44. Alliston T, Derynck R: Medicine: interfering with bone remodelling. *Nature* 416:686-687, 2002
45. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389:990-994, 1997
46. Li F, Xia W, Li A, et al: Long-term inhibition of Rho kinase with fasudil attenuates high flow induced pulmonary artery remodeling in rats. *Pharmacol Res* 55:64-71, 2007
47. Yamaguchi H, Kasa M, Amano M, et al: Molecular mechanism for the regulation of rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. *Structure* 14:589-600, 2006
48. Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514, 1998
49. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 22:32-39, 2001
50. Shimokawa H, Hiramori K, Inuma H, et al: Anti-anginal effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina: a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:751-761, 2002
51. Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, et al: Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 287:337-342, 2001
52. Yada T, Shimokawa H, Kajiya F: Cardioprotective effect of hydroxyfasudil as a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microvessels in vivo. *Clin Hemorheol Microcirc* 34:177-183, 2006
53. Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, et al: Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res* 1154:215-224, 2007
54. Satoh S, Toshima Y, Ikegaki I, et al: Wide therapeutic time window for fasudil neuroprotection against ischemia-induced delayed neuronal death in gerbils. *Brain Res* 1128:175-180, 2007
55. Shibuya M, Hirai S, Seto M, et al: Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *J Neurol Sci* 238:31-39, 2005
56. Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al: Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*:39-46, 1996
57. Boguslawski G, Hale LV, Yu XP, et al: Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C-dependent pathways. *J Biol Chem* 275:999-1006, 2000
58. Vrotsos Y, Miller SC, Marks SC, Jr.: Prostaglandin E--a powerful anabolic agent for generalized or site-specific bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 13:255-263, 2003

59. Okada Y, Pilbeam C, Raisz L, et al: Role of cyclooxygenase-2 in bone resorption. *J Uoeh* 25:185-195, 2003
60. Marks SC, Jr., Miller SC: Local delivery of prostaglandin E1 induces periodontal regeneration in adult dogs. *J Periodontal Res* 29:103-108, 1994
61. Norrdin RW, Jee WS, High WB: The role of prostaglandins in bone in vivo. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 41:139-149, 1990
62. Raisz LG, Pilbeam CC, Fall PM: Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone. *Osteoporos Int* 3 Suppl 1:136-140, 1993
63. Raisz LG, Koolemans-Beynen AR: Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E2 in organ culture. *Prostaglandins* 8:377-385, 1974
64. Schelling SH, Wolfe HJ, Tashjian AH, Jr.: Role of the osteoclast in prostaglandin E2-stimulated bone resorption: a correlative morphometric and biochemical analysis. *Lab Invest* 42:290-295, 1980
65. Jee WS, Ueno K, Deng YP, et al: The effects of prostaglandin E2 in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcif Tissue Int* 37:148-157, 1985
66. High WB: Effects of orally administered prostaglandin E-2 on cortical bone turnover in adult dogs: a histomorphometric study. *Bone* 8:363-373, 1987
67. Jee WS, Mori S, Li XJ, et al: Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone* 11:253-266, 1990
68. Norrdin RW, Shih MS: Systemic effects of prostaglandin E2 on vertebral trabecular remodeling in beagles used in a healing study. *Calcif Tissue Int* 42:363-368, 1988
69. Shih MS, Norrdin RW: PGE2 induces regional remodeling changes in haversian envelope: a histomorphometric study of fractured ribs in beagles. *Bone Miner* 1:227-234, 1986
70. Shih MS, Norrdin RW: Effect of prostaglandin E2 on rib fracture healing in beagles: histomorphometric study on periosteum adjacent to the fracture site. *Am J Vet Res* 47:1561-1564, 1986
71. Ueda K, Saito A, Nakano H, et al: Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E1 in infants with cyanotic congenital heart disease. *J Pediatr* 97:834-836, 1980
72. Marks SC, Jr.: Prostaglandins and the skeleton: the legacy and challenges of two decades of research. *Endocrine Journal* (1993),1, :337-344, 1993
73. Marks SC, Jr., Miller S: Local infusion of prostaglandin E1 stimulates mandibular bone formation in vivo. *J Oral Pathol* 17:500-505, 1988
74. Miller SC, Marks SC, Jr.: Local stimulation of new bone formation by prostaglandin E1: quantitative histomorphometry and comparison of delivery by minipumps and controlled-release pellets. *Bone* 14:143-151, 1993
75. Miller SC, Marks SC, Jr.: Alveolar bone augmentation following the local administration of prostaglandin E1 by controlled-release pellets. *Bone* 14:587-593, 1993
76. Lin BY, Jee WS, Ma YF, et al: Effects of prostaglandin E2 and risedronate administration on cancellous bone in older female rats. *Bone* 15:489-496, 1994
77. Okamoto F, Kajiya H, Fukushima H, et al: Prostaglandin E2 activates outwardly rectifying Cl(-) channels via a cAMP-dependent pathway and reduces cell motility in rat osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C114-124, 2004



78. Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, et al: Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4580-4585, 2002
79. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, et al: Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:661-690, 2001
80. Paralkar VM: An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. *PNAS*, may 27,2003 100 no. 11, 2003
81. Weinreb M, Machwate M, Shir N, et al: Expression of the prostaglandin E(2) (PGE(2)) receptor subtype EP(4) and its regulation by PGE(2) in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue. *Bone* 28:275-281, 2001
82. Weinreb M, Grosskopf A, Shir N: The anabolic effect of PGE2 in rat bone marrow cultures is mediated via the EP4 receptor subtype. *Am J Physiol* 276:E376-383, 1999
83. Miyaura C, Inada M, Suzawa T, et al: Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. *J Biol Chem* 275:19819-19823, 2000
84. Suzawa T, Miyaura C, Inada M, et al: The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* 141:1554-1559, 2000
85. Bichell DP, Rotwein P, McCarthy TL: Prostaglandin E2 rapidly stimulates insulin-like growth factor-I gene expression in primary rat osteoblast cultures: evidence for transcriptional control. *Endocrinology* 133:1020-1028, 1993
86. McCarthy TL, Centrella M: Local IGF-I expression and bone formation. *Growth Horm IGF Res* 11:213-219, 2001
87. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, et al: Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res*:102-118, 2003
88. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, et al: Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *J Orthop Trauma* 3:276-282, 1989
89. Nuss KM, Auer JA, Boos A, et al: An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord* 7:67, 2006
90. Hildebrand T, Laib, A., Müller, R., Dequeker, J., and Rüdsegger, P: Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest and calcaneus. *J Bone Miner Res* 14: 1167-1174;. 1999
91. Rüdsegger P, Koller, B., and Müller, R. A.: A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 58:24-9;. 1996
92. Barth A: Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen. *Arch Klin Chir*, 1893
93. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65, 1998
94. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663-670, 1998
95. Génot O: Evaluation von vier biograduierbaren, injizierbaren Knochenzementen in einer experimentellen Studie in Schafen, Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich,.69, 2006

96. Oberle A, Theiss F, Böhner M, et al: [Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep]. Schweiz Arch Tierheilkd 147:482-490, 2005
97. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, et al: In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. Biomaterials 25:1439-1451, 2004
98. Kühn K: Biokompatibilität verschiedener Komposite als Knochenersatzstoffe, eine Studie am Schaf. Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, 2007
99. Böhner M: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. Injury 31 Suppl 4:37-47, 2000
100. Benghuzzi H: Cytological evaluation of capsular tissue surrounding TCPL implant in adult rats. Biomed Sci Instrum 32:81-86, 1996
101. Liebich H-G: Funktionelle Histologie, Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere, 2. Auflage 1993
102. Habal MBR, A.H.: Bone grafts and bone graft substitutes. Saunders, Philadelphia 1992

## 7 Anhang

**Tabelle 16: Ergebnisse der Histomorphometrie, Angaben in  $\mu\text{m}^2$**

Gruppe	Identifikation	Gesamtfläche	Bindegewebe	Knochen	Hintergrund	Biomaterial
<b>I chronOs unbeh.</b>	3701 FL	24654000	5191200	4603700	11625000	3233800
	3701 FR	24654000	5940100	3332100	11612000	3769000
	3701 TL	24654000	1867800	5964400	11614000	5207700
	3701 TR	24654000	3521500	2897700	11617000	6616800
	3702 FR	24654000	4206200	2797600	11624000	6025700
	3702 TL	24654000	4470400	2748400	11615000	5820000
	3702 TR	24654000	5867200	2907400	11615000	4263600
	3703 FL	24654000	5731900	3816500	11616000	3489200
	3703 FR	24654000	4514900	3982300	11623000	4533000
	3703 TL	24654000	2589900	3840800	16246000	1975900
	3703 TR	24654000	3988900	2016200	11609000	7039400
<b>II PGE<sub>2</sub> 1<math>\mu</math>M</b>	3704 FL	24654000	3949400	4329200	11608000	4766500
	3704 TL	24654000	1325500	4311100	14779000	4237100
	3704 TR	24654000	1262600	3557800	11622000	8210900
	3705 FL	24654000	2014600	5354000	11625000	5659000
	3705 FR	24654000	2329800	2374400	13819000	6128700
	3705 TL	24654000	3318300	3555200	11617000	6162600
	3705 TR	24654000	5290200	2725600	11600000	5035400
	3706 FL	24654000	6129200	2883300	11598000	4042100
	3706 FR	24654000	4288000	4701800	12707000	2956500
	3706 TL	24654000	5025900	1030100	11599000	6998100
	3706 TR	24654000	3821900	3607000	11608000	5616900
<b>III PGE<sub>2</sub> 50<math>\mu</math>M</b>	3707 FR	24654000	4904500	5132500	11670000	2946700
	3707 TL	24654000	3109400	6260900	12590000	2692200
	3707 TR	24654000	2487900	4858100	11624000	5682900
	3708 FR	24654000	3897700	4961100	11613000	4181800
	3708 TL	24654000	2248000	4289100	11965000	6149700
	3708 TR	24654000	3131900	4959600	11616000	4945700
	3709 FL	24654000	6165300	4003100	11610000	2874500
	3709 FR	24654000	4653900	4814500	11629000	3556100
	3709 TL	24654000	1231500	7707500	11600000	4113000
	3709 TR	24654000	4438000	5754000	11600000	2860900
<b>IV Hy 10<math>\mu</math>M</b>	3710 FL	24654000	4818800	4884000	11608000	3341800
	3710 FR	24654000	3969200	4672800	11608000	4403900
	3710 TL	24654000	1996300	5716600	11798000	5142700
	3710 TR	24654000	2131000	5459200	11599000	5464100
	3711 FL	24654000	3084300	6135200	11607000	3826800
	3711 FR	24654000	5110200	4672400	11608000	3261200
	3711 TL	24654000	2832100	5069700	11598000	5154000
	3711 TR	24654000	3541500	5524800	11614000	3973100
	3712 FR	24654000	3537900	3751200	15219000	2145500
	3712 TL	24654000	5346000	3756100	11619000	3932000
	3712 TR	24654000	1698500	3891500	11750000	7313200
<b>V Hy 100<math>\mu</math>M</b>	3713 FL	24654000	3239800	5671200	11615000	4127200
	3713 FR	24654000	4480000	5268200	11600000	3303300
	3713 TL	24654000	2015300	5578500	11598000	5461700
	3713 TR	24654000	2666400	7084300	11599000	3304100
	3715 FL	24654000	4955000	2869500	11598000	5230700
	3715 FR	24654000	4789800	2405300	11619000	5839600
	3715 TL	24654000	2681600	3066400	11598000	7306800
	3715 TR	24654000	5305100	2706100	11600000	5040800

**Tabelle 17: Ergebnisse der qualitativen histologischen Auswertung**

Gruppe	Identifikation	Proteogl.% Gesichtsfeld A	Proteogl.% Gesichtsfeld B	Proteogl.% Gesichtsfeld C	Zellen ja/nein
<b>I</b> chronOS unbeh.	3701 FL	1	1	0	1
	3701 FR	1	1	1	1
	3701 TL	1	2	1	1
	3701 TR	1	2	0	1
	3702 FR	2	2	2	1
	3702 TR	1	2	0	0
	3703 FL	1	1	0	1
	3703 FR	1	2	0	0
	3703 TL	1	2	1	0
	3703 TR	1	2	0	0
<b>II</b> PGE <sub>2</sub> 1µM	3704 FL	1	2	2	1
	3704 TR	1	3	2	1
	3705 FR	1	2	1	1
	3705 TL	1	1	0	0
	3705 TR	2	2	0	0
	3706 FR	1	2	0	1
	3706 TL	1	2	0	0
<b>III</b> PGE <sub>2</sub> 50µM	3707 FR	2	1	0	0
	3707 TL	1	1	0	0
	3707 TR	2	2	2	1
	3708 FR	2	2	0	0
	3708 TL	2	2	0	1
	3708 TR	2	2	0	0
	3709 FL	1	2	1	1
	3709 FR	2	2	1	1
	3709 TL	1	1	0	1
<b>IV</b> Hy 10µM	3710 FL	2	2	1	1
	3710 FR	2	2	0	1
	3710 TL	1	1	0	1
	3710 TR	1	2	0	1
	3711 FL	1	1	0	1
	3711 FR	2	1	1	1
	3711 TR	1	2	0	1
	3712 FR	2	1	0	1
	3712 TR	1	1	1	1
<b>V</b> Hy 100µM	3713 FL	1	2	1	1
	3713 FR	2	2	0	0
	3713 TL	1	2	0	1
	3713 TR	1	2	1	1
	3715 FL	1	1	0	1
	3715 FR	1	1	1	1
	3715 TL	1	1	0	0
	3715 TR	1	1	0	0

Nach Scoringtabelle 3 und 4



**Abb. 2:**

Lagerung der Schafe während der Operation. Die linke Hintergliedmaße liegt leicht angewinkelt auf dem Operationstisch, die rechte ist, ebenfalls angewinkelt, im 90° Winkel an einem Haltestab befestigt.



**Abb. 3:**

Das Bild zeigt das Setzen des Bohrlochs. Die Arretierung gewährleistet eine konstante Bohrlochtiefe von 13mm.



**Abb. 4:**

In der sterilen Spritze befinden sich vier Implantate, die unter Vakuum mit frisch gewonnenem, arteriellem Blut perfundiert wurden.



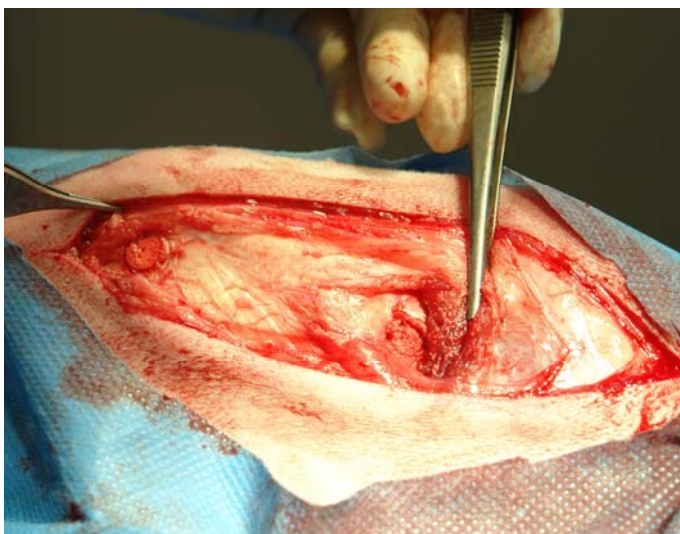
**Abb. 5:**

Das Bild zeigt den speziell angefertigten Stößel für die Insertion der Knochenimplantate.



**Abb. 6:**

Leichte Schläge mit dem Hammer ermöglichen eine gleichmäßige Versenkung der Implantate im Bohrloch.



**Abb 7:**

Das Bild zeigt die in Femur (rechts) und Tibia (links) eingesetzten Implantate.



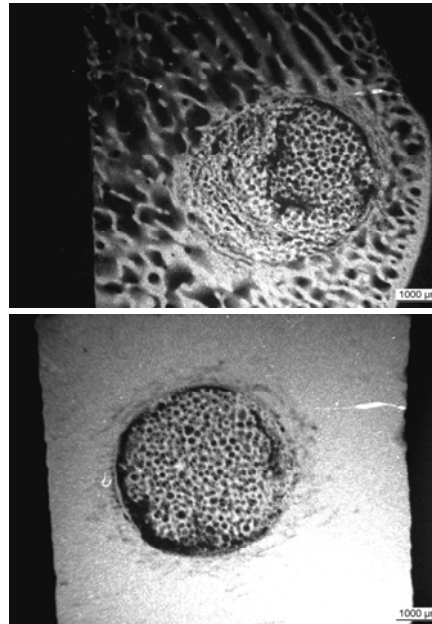
**Abb. 8:**  
Eine nach der Operation durchgeführte medio-laterale Röntgenaufnahme von Femur (oben) und Tibia (unten) der Gruppe IV.



**Abb. 9:**  
Makroskopische Aufnahme eines Bohrlochdefekts nach der Schlachtung (Femur der Gruppe IV).

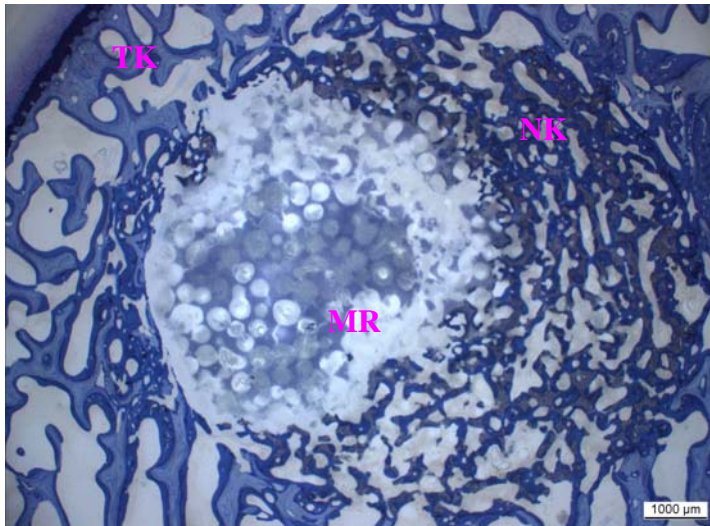


**Abb. 10:**  
Radiologische Aufnahme des Bohrlochdefekts nach der Schlachtung (Tibia der Gruppe I im medio-lateralen Strahlengang)



**Abb. 11:**  
Mikroradiologische Aufnahmen der Dickschnitte. Oben: Femur der Gruppe I, unten: Tibia der Gruppe I.



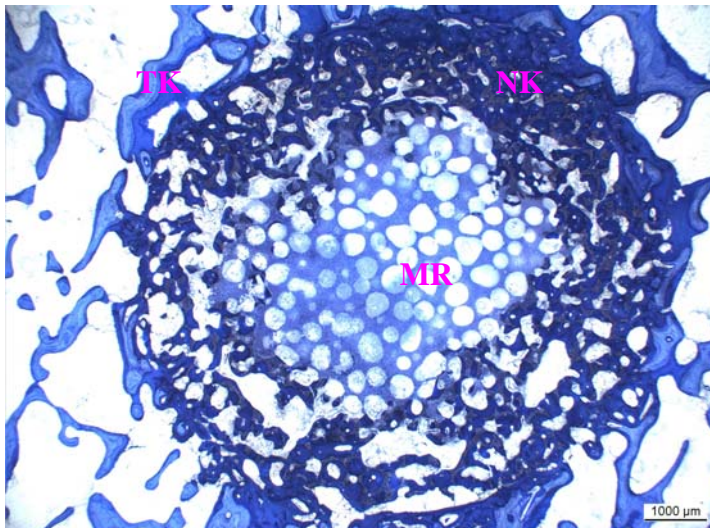


**Abb. 12:**

Dickschnitt der *Femurgruppe I*.

Das Bohrloch ist umgeben von altem, trabekulärem Knochen (TK). Der neugebildete Knochen zeigt sich dunkelblau (NK). Die Implantatreste sind durch die schwammartige Struktur gut zu erkennen (MR).

Färbung: Toluidinblau

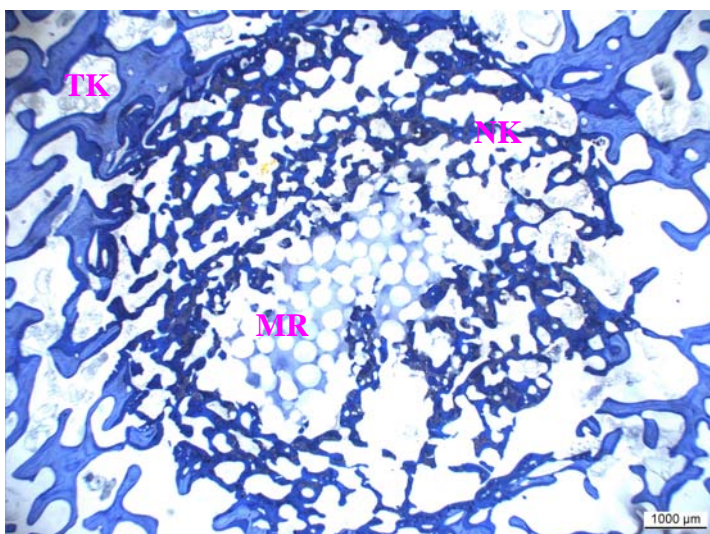


**Abb. 13:**

Dickschnitt der *Femurgruppe IV*.

Hier ist die zentripetal verlaufende Trabekelstruktur (NK) bereits sehr viel ausgeprägter. Das Bohrloch ist ebenfalls von trabekulärem Knochen umgeben (TK) und weist in der Mitte Reste des Implantats auf (MR).

Färbung: Toluidinblau



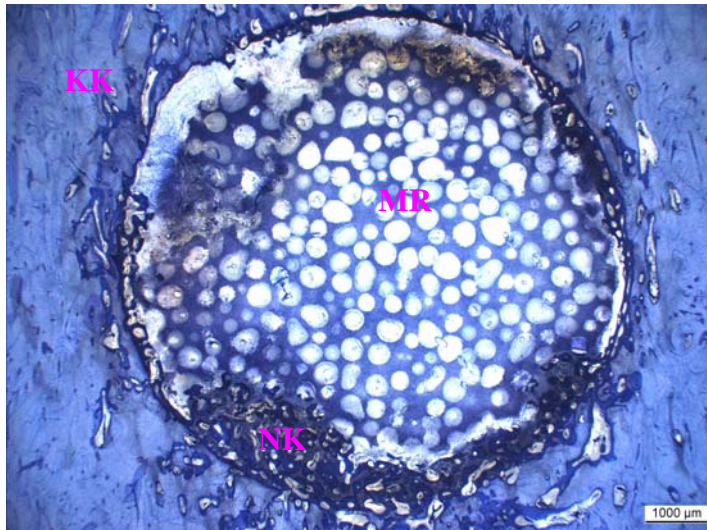
**Abb. 14:**

Dickschnitt der *Femurgruppe III*.

Von trabekulärem Knochen umgeben (TK) ist dieses Bohrloch nahezu vollständig von neugebildetem Knochen durchwachsen (NK). Reste des Implantats sind hingegen kaum noch vorhanden (MR).

Färbung: Toluidinblau

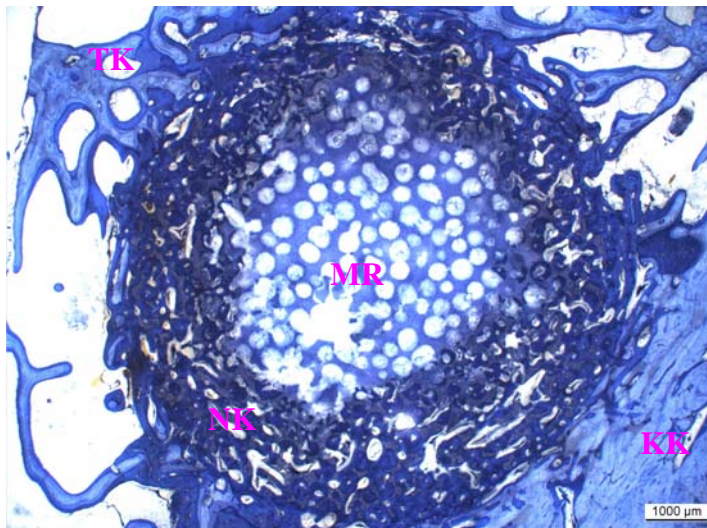


**Abb. 15:**

Dickschnitt der *Tibiagruppe I*.

Das Bohrloch ist von kortikalem Knochen (KK) umgeben. Neben wenig neugebildetem Knochen (NK) sind vor allem die Reste des Implantats (MR) zu erkennen.

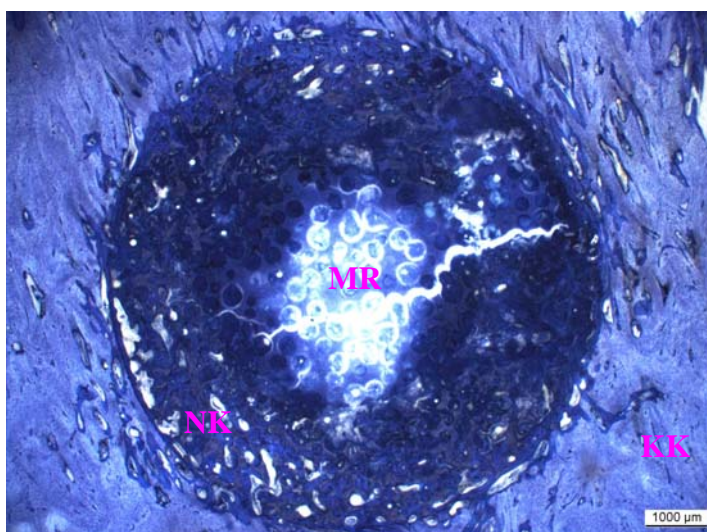
Färbung: Toluidinblau

**Abb. 16:**

Dickschnitt der *Tibiagruppe IV*.

Das Bohrloch befindet sich am Übergang von trabekulärem (TK) zu kortikalem (KK) Knochen. Es zeigt deutlich mehr neugebildeten Knochen (NK) und weniger Implantatreste (MR).

Färbung: Toluidinblau

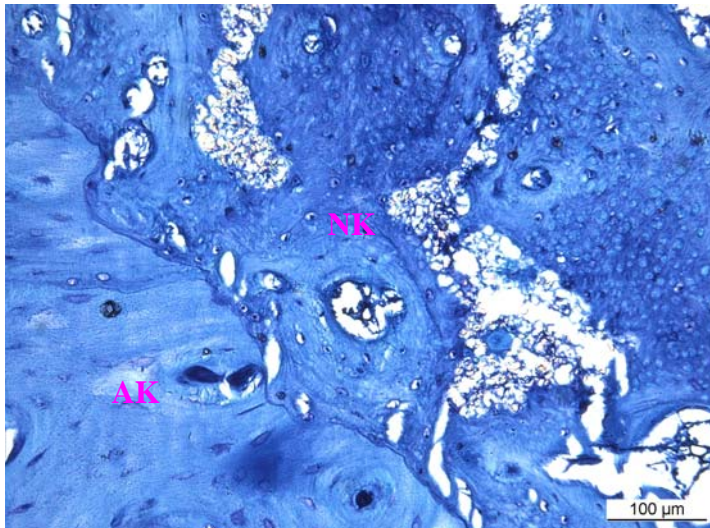
**Abb. 17:**

Dickschnitt der *Tibiagruppe III*.

Von kortikalem Knochen (KK) umgeben zeigt dieses Bohrloch am meisten neugebildeten Knochen (NK) und am wenigsten noch vorhandenes Implantat (MR).

Färbung: Toluidinblau



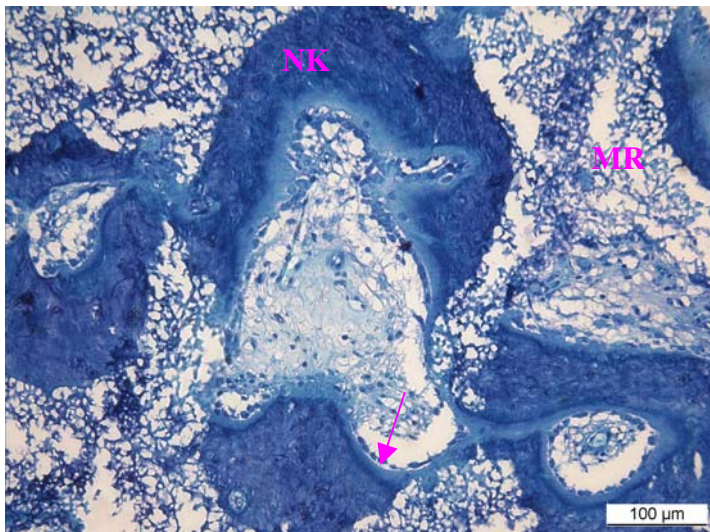


**Abb. 18:**

*Gesichtsfeld A:* zu sehen ist der Übergang von altem (AK) zu neugebildetem (NK) Knochen am Rande des Bohrlochs.

*Gruppe I*

Färbung Toluidinblau

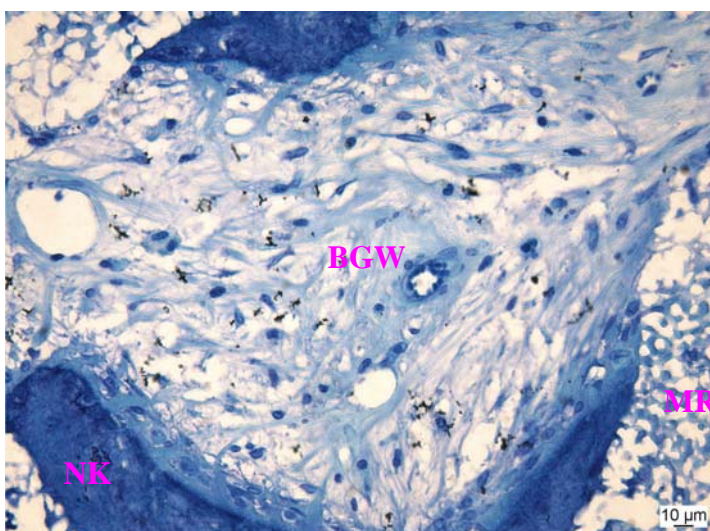


**Abb. 19:**

*Gesichtsfeld B:* neugebildete Knochenmanschetten (NK) mit einem Osteoblastensaum (Pfeil) sind umgeben von Resten des Implantatmaterials (MR).

*Gruppe I*

Färbung: Toluidinblau

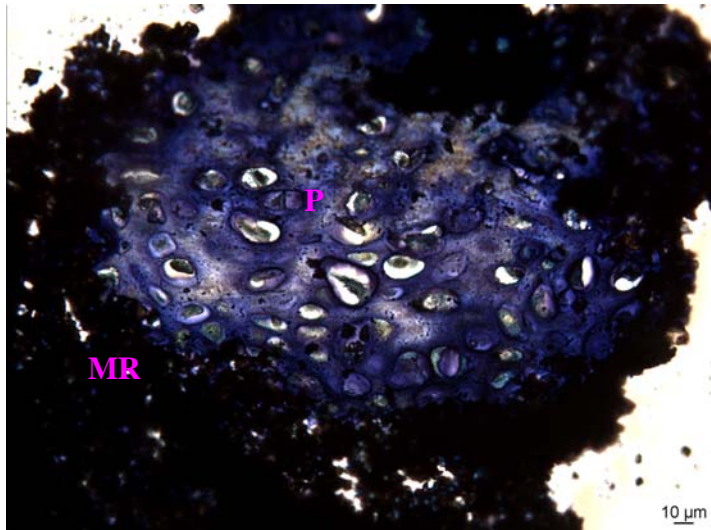


**Abb. 20:**

*Gesichtsfeld C:* In der Mitte dieses Bohrlochs befinden sich neben einigen neugebildeten Knochenmanschetten (NK) und Resten des Materials (MR) vor allem gefäßreiches Bindegewebe (BGW).

*GuppeIV*

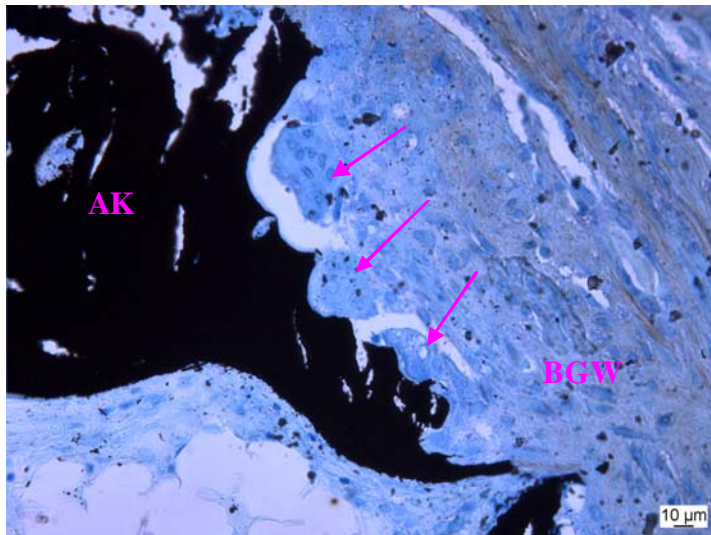
Färbung: Toluidinblau

**Abb. 21:**

Auf diesem Bild sind stark angefarbte Proteoglykanablagerungen (P) zu erkennen, die auf eine enchondrale Ossifikation hinweisen. Sie sind von körnig aussehenden Materialresten (MR) umgeben, die sich in dieser Färbung schwarz anfärben.

*Gruppe I*

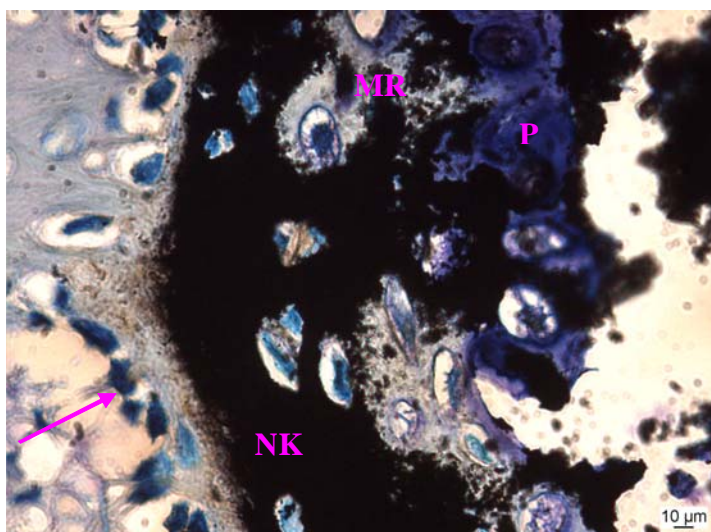
Färbung: van Kossa

**Abb. 22:**

Das Bild zeigt den Übergang von altem Knochen (AK) zu Bindegewebe (BGW) am Rande des Bohrlochs. In der Resorptionszone sind Osteoklasten (Pfeile) sichtbar.

*Gruppe IV*

Färbung: van Kossa

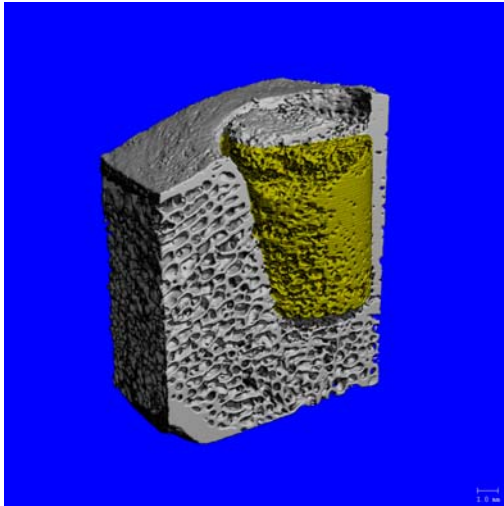
**Abb. 23:**

Dieses Bild zeigt den Einbau des Implantatmaterials (MR) in den neugebildeten Knochen (NK), der von einem Osteoblastensaum (Pfeil) bedeckt ist. Die Proteoglykanablagerungen (P) sind deutlich violett angefärbt.

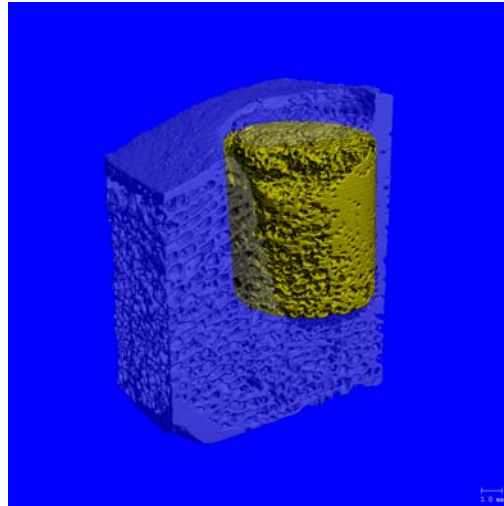
*Gruppe II*

Färbung: van Kossa

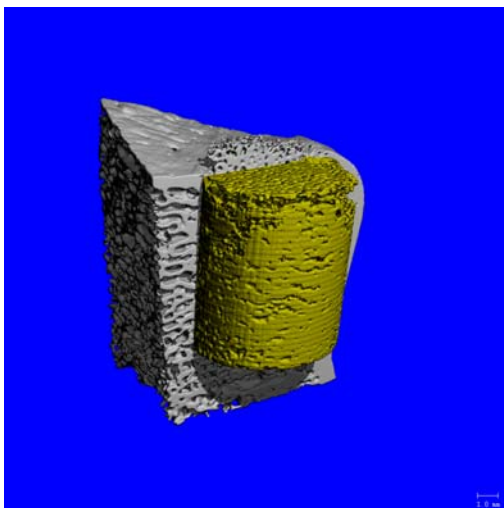




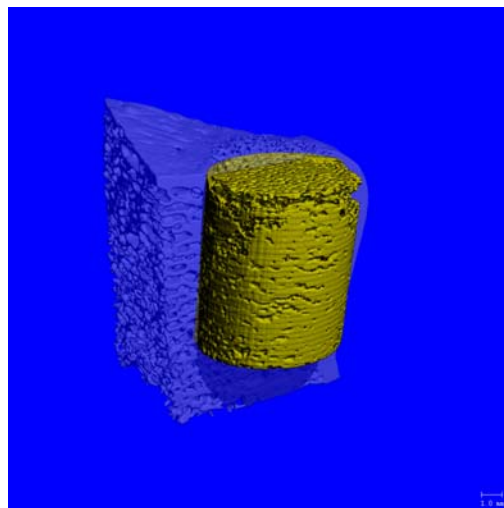
**Abb. 24:**  
Mikro CT Aufnahme parallel zur Längsachse des Implantates. Der Knochenanteil ist grau, der sog. Implantatanteil gelb dargestellt und besteht aus Implantat und neu gebildetem Knochen.  
(Femur der Gruppe III)



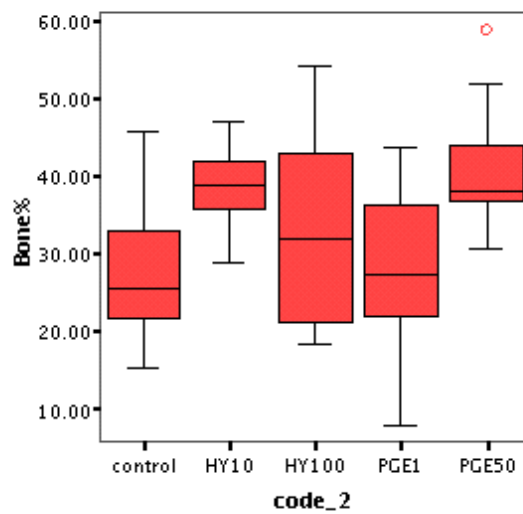
**Abb. 25:**  
In dieser Mikro CT Aufnahme ist der Implantatteil (gelb) hervorgehoben. Deutlich erkennbar sind die Ausbrüche an der Seite des Implantates.  
(Femur der Gruppe III)



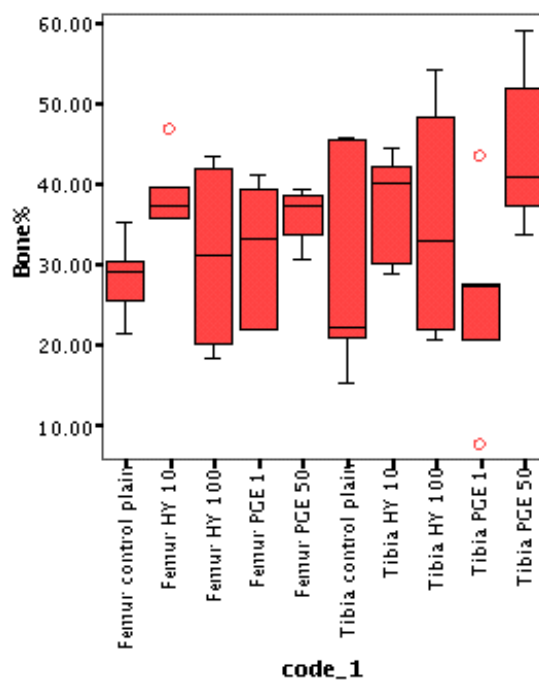
**Abb. 26:**  
Dieses Mikro CT Bild zeigt ebenfalls einen Längsschnitt parallel zum Implantat. Das gelbe Implantat ist von grauem Knochen umgeben.  
(Femur der Gruppe IV)



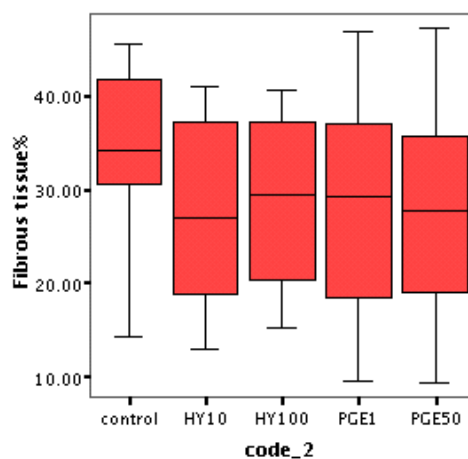
**Abb. 27:**  
Bei diesem Mikro CT Bild wirkt das gelb hervorgehobene Implantat im Vergleich zu Abb. 25 noch relativ kompakt.  
(Femur der Gruppe IV)

**Abb.28:**

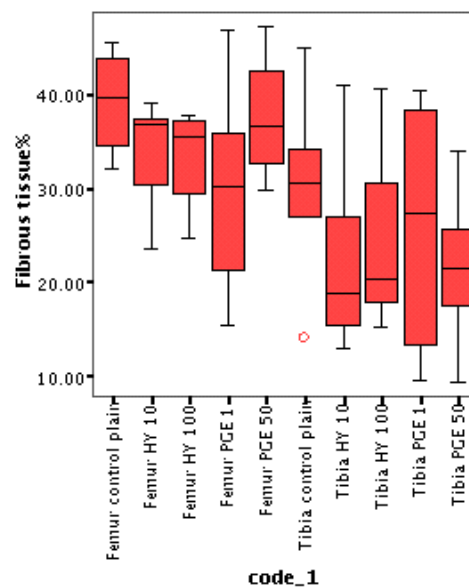
Diese Grafik zeigt den prozentualen Anteil an neugebildetem Knochen in den fünf untersuchten Gruppen. Femur- und Tibiaproben sind hier zusammengefasst.

**Abb.29:**

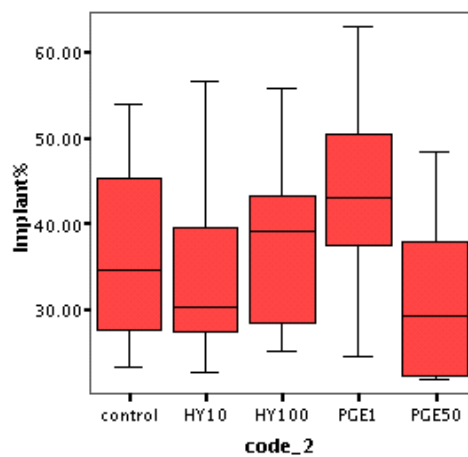
In dieser Grafik wird der prozentuale Anteil neugebildeten Knochens in den Femur- und Tibiaproben der fünf Gruppen getrennt betrachtet.

**Abb. 30:**

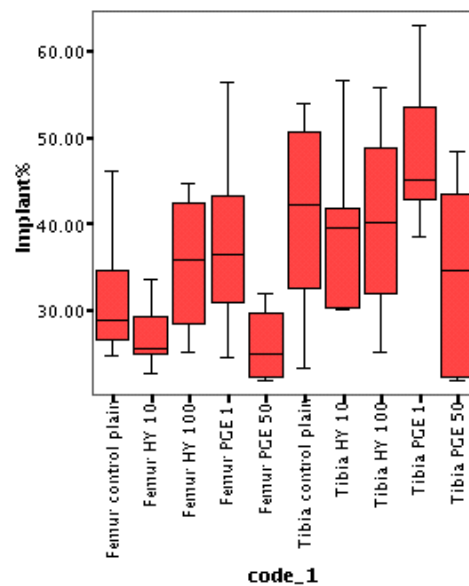
Bindegewebsanteil der fünf verschiedenen Gruppen in %. Dabei werden Femur- und Tibiaproben gemeinsam betrachtet.

**Abb. 31:**

Getrennte Betrachtung des prozentualen Bindegewebsanteil von Femur- und Tibiaproben der fünf Gruppen.

**Abb. 32:**

Prozentualer Anteil des noch vorhandenen Implantats in den fünf Untersuchungsgruppen unter Zusammenfassung der Femur- und Tibiaproben.

**Abb. 33:**

Implantatanteil der fünf Gruppen in % bei getrennter Betrachtung von Femur- und Tibiaproben.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

β-TCP	beta-Trikalzium-Phosphat
cAMP	zyklisches 3`5 Adenosin Monophosphat
control plain	Kontrollgruppe mit unbehandelten β-TCP Blöcken
chronOS	Knochenersatzmaterial aus Trikalziumphosphat
CSD	critical size defect
dist.	distal
FL	Femur links
FR	Femur rechts
Hy	Hydroxyfasudil
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
J	Jahre
KGW	Körpergewicht
MMA	Methylmetacrylat
μA	Mikroamper
μCT	Mikro Computertomogramm
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
NO	Stickstoffmonoxid
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
p.o.	per os
Proteogl.	Proteoglykanablagerungen
prox.	proximal
ROCK	Rho-kinase
s.c.	subkutan
unbeh.	unbehandelt
Wo	Wochen

## 9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Chefin **Prof. Dr. Brigitte v. Rechenberg** für die Überlassung des Themas, die unermüdliche fachliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit und vor allem für die menschliche Betreuung.

Herrn **Prof. Dr. Hans Geyer** danke ich vielfmals für die Übernahme des Korreferates.

Bei meinen Projektpartnern, **Milvia Lepre, Andrea Montali** (Synthes Oberdorf) und **Thomas Kohler** (ETH Zürich), möchte ich mich sehr für die unglaublich nette Zusammenarbeit und die Unterstützung meines Projektes bedanken.

Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Jörg A. Auer, Gaby Schmid** und **Rainer Egle** für die stets freundliche Unterstützung der MSRU.

Unserer lieben **Käthi Kämpf** danke ich nicht nur für die Hilfe im Labor sondern auch für ihre immer freundliche, sonnige und hilfsbereite Art.

Vielen Dank auch an Frau **Dr. Monika Hilbe, Kati Zlinsky** und **Sabina Wunderlin** für die geduldige Hilfe bei der Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate.

Ich bedanke mich beim **Anästhesie-Team**, dem **gesamten Team der Rinderklinik**, den **Fahrern** und **Tierpflegern** des Tierspitals Zürich, sowie dem Ehepaar **Rösli und Gottfried Knüsel** vom Staffelegghof, ohne deren Hilfe die Durchführung der Operationen und die Betreuung unserer Schafe nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonders großes Dankeschön für diese unvergessliche Zeit gilt meinen Kollegen und Freunden aus der MSRU: **Inga Plate, Kristina Biermeier, Karina Klein, Birthe Pegel, Hannah Junge, Stephanie v. Plocki, Friederike Ohle, Dorothee Heidenreich, Sven Nielsen, Bernadette Linsbichler, Silvana Manzanell, Marcella v. Salis-Soglio, Käthi Kämpf, Dinah Streifeneder, Karolin Kühn, Katrin Völter, Alexander Stahl, Corinne Invernizzi, Lena und Oliver Salesov, Jens Langhoff, Katja Nuss, Sabine Koch, Anja und Martin Waselau, Michelle Siedler, Peter Kronen.**

Abschließend möchte ich von ganzem Herzen **meinen Eltern, Nepeta und Ernst-Wilhelm v. Wedel, meinen Geschwistern, Sylvia, Wedigo, Marie, Anna, Hubertus, Sophie** und natürlich auch **meinen Freunden** danken, mit deren Liebe, Hilfe und Unterstützung ich stets rechnen konnte.

Im Gedenken an **meine Schafe.**



---

## Curriculum vitae

Name	Friederike von Wedel
Geburtstag	18.05.1978
Geburtsort	Ulm, Deutschland
Nationalität	deutsch
Schulbildung	
1993-1998	Internat Kloster Wald
Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung	
1995-1999	schulbegleitende Ausbildung zur Schneidergesellin, Internat Kloster Wald
2002-2004	Ausbildung und Arbeit als Rettungssanitäter, Arbeiter-Samariter-Bund, Leipzig
Studium	
Okt. 1999-Sept. 2001	Humanmedizinstudium an der Universität Leipzig
Okt. 2001-Feb. 2007	Tiermedizinstudium an der Universität Leipzig
Nov. 2005-April 2006	Erasmus-Austauschsemester an der Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich
Feb. 2007	Approbation als Tierärztin an der Universität Leipzig
Dissertation	
März 2007–Juni 2008	Mitarbeit in der MSRU, Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich Dissertation bei Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, ECVS, Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, MSRU
Seit Juli 2008	Internship am Tierspital der Universität Zürich, Klinik für Kleintierchirurgie

---